

MARCELO COSTA

ISOMETRIA DO DIMORFISMO SEXUAL DO TAMANHO EM MUSCIDAE

Tese apresentada a Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Dr. Mauricio Osvaldo Moura

Co-orientador: Dr. Claudio José Barros de Carvalho

CURITIBA

2014

*"Não é o mais forte que sobrevive,  
nem o mais inteligente, mas o que  
melhor se adapta às mudanças"*

Charles Darwin

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Mauricio Osvaldo Moura, pela orientação, pelas conversas e principalmente pela amizade ao longo desses anos.

Ao Professor Dr. Claudio J. Barros de Carvalho pela Co-orientação e por permitir que eu analisasse os exemplares de Diptera depositados na Coleção Entomológica Pe. Jesus Santiago Moure.

A professora Dra. Marcia Couri Curadora da coleção de Diptera do Museu Nacional – RJ, por ceder à infraestrutura de seu laboratório e permitir a análise dos exemplares depositados na coleção de Diptera do Museu Nacional, como também pela hospitalidade.

À coordenação e os professores do Programa de Pós-graduação em Entomologia da Universidade Federal do Paraná - UFPR.

Aos colegas do laboratório de Dinâmicas Ecológicas pela convivência e amizade ao longo desses anos...

Aos integrantes do laboratório de Biodiversidade e Biogeografia de Diptera, pelo auxílio no manuseio dos exemplares de Muscidae, em especial André, Diana e Lica.

A minha esposa, Marta, que sempre me apoiou e incentivou durante os momentos difíceis e principalmente por compreender a minha ausência ao longo desses anos.

Ao apoio fundamental de meus pais, Miguel e Zali, como também do meu irmão, Adriano, os quais sempre me incentivaram.

A Doutoranda Georgia C. Kosmala, pela revisão do abstract.

A banca examinadora, por aceitar o convite e despende o tempo para correções e sugestões sobre a tese.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS . . . . .	07
LISTA DE FIGURAS . . . . .	08
RESUMO . . . . .	10
ABSTRACT . . . . .	11
1. INTRODUÇÃO . . . . .	12
2. OBJETIVOS . . . . .	19
3. MATERIAL E MÉTODOS . . . . .	20
3.1. <i>Amostragem</i> . . . . .	20
3.2. <i>Filogenia composta de Muscidae</i> . . . . .	22
3.3. <i>Cálculo dos contrastes filogenéticos independentes de Felsenstein</i> <i>(PICs – “Phylogenetic independent contrasts”)</i> . . . . .	25
3.4. <i>Alometria do dimorfismo sexual do tamanho em Muscidae</i> . . . . .	28
3.5. <i>Medida da taxa de evolução do tamanho</i> . . . . .	30
3.6. <i>Ajustes dos modelos evolutivos</i> . . . . .	31
3.7. <i>Reconstrução dos estados ancestrais de caracteres</i> . . . . .	32
4. RESULTADOS . . . . .	34
4.1. <i>Descrição do dimorfismo sexual do tamanho em Muscidae</i> . . . . .	34
4.2. <i>Análise alométrica do SSD em Muscidae</i> . . . . .	36

4.3. <i>Taxa de evolução de machos e fêmeas . . . . .</i>	38
4.4. <i>Ajustes dos modelos de evolução do caráter . . . . .</i>	38
4.5. <i>Reconstrução do tamanho e dimorfismo sexual do tamanho em Muscidae. . . . .</i>	40
5. DISCUSSÃO . . . . .	42
5.1. <i>Dimorfismo sexual no tamanho em Muscidae . . . . .</i>	42
5.2. <i>Isometria em Muscidae . . . . .</i>	43
5.3. <i>Quebra da regra de Rensch . . . . .</i>	47
5.4. <i>Conclusões gerais . . . . .</i>	48
6. REFERÊNCIAS . . . . .	50
ANEXO I . . . . .	56
ANEXO II . . . . .	61
ANEXO III . . . . .	69
ANEXO VI . . . . .	75
ANEXO V . . . . .	79
ANEXO VI . . . . .	83
ANEXO VII . . . . .	85
ANEXO VIII . . . . .	87

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Taxa de evolução ( $\sigma^2$ ) do tamanho de machos e fêmeas de Muscidae e dos clados analisados e resultado do teste da razão de verossimilhança – LRT (“*likelihood ratio test*”) com a probabilidade associada (P). . . . . 38

**Tabela 2** – Valor de log-likelihood para os modelos de evolução de caráter ajustados para o tamanho de machos e fêmeas e valor do teste de razão de verossimilhança (LRT - likelihood ratio test) com a probabilidade associada (P) nos diferentes níveis taxonomicos . . . . . 39

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Modelo de regressão para estimar a alometria do dimorfismo sexual do tamanho. A linha diagonal sólida (vermelha) representa um modelo isométrico ( $\beta=1$ ). SSD enviesado para machos é representado acima da linha diagonal sólida e SSD enviesada para fêmeas é representada abaixo da linha diagonal sólida. A linha pontilhada (verde) representa uma hipoalometria ( $\beta<1$ ) do SSD, onde o tamanho das fêmeas varia mais que o tamanho dos machos. A linha tracejada (azul) representa uma hiperalometria ( $\beta>1$ ) do SSD, onde o tamanho dos machos varia mais que o tamanho das fêmeas, sendo assim consistente com a regra de Rensch. Figura adaptada de Fairbairn (1997) . . . . . 15
- Figura 2** – Representação da medida geral do comprimento total do tórax (linha tracejada) dos exemplares de Muscidae analisados. Imagem parcial de uma fêmea de *Charadrella malacophaga* Lopes, 1938. . . . . 20
- Figura 3** – Filogenia composta contendo as 132 espécies de Muscidae analisada. As informações na lateral da filogenia indicam os quatro clados subordinados de Muscidae e as famílias pertencentes a cada clado utilizado nas análises. . . . . 24
- Figura 4** – Distribuição do índice de dimorfismo sexual do tamanho (SDI) das espécies de Muscidae. Valores positivos indicam dimorfismo sexual do tamanho enviesado para fêmeas e valores negativos indicam um dimorfismo sexual do tamanho enviesado para os machos. Linha pontilhada indica valor zero de SDI . 34



**Figura 5** – Distribuição do índice de dimorfismo sexual do tamanho (SDI) das espécies dos quatro clados subordinados à Muscidae analisados. Valores positivos indicam dimorfismo sexual do tamanho enviesado para fêmeas e valores negativos indicam um dimorfismo sexual do tamanho enviesado para os machos. F = fêmeas, M= machos. Linha tracejada indica SDI=0 . . . . . 35

**Figura 6** – Regressão por Eixo Principal Reduzido (RMA) dos contrastes independentes dos machos (PICs) em relação aos contrastes independentes das fêmeas (PICs) do tamanho médio do tórax das espécies de Muscidae. A linha escura representa o modelo isométrico ( $\beta=1$ ) e a linha vermelha representa o ajuste do modelo RMA com intervalo de confiança de 95% (linhas tracejadas) . 36

**Figura 7** – Regressão por Eixo Principal Reduzido (RMA) dos contrastes independentes dos machos (PICs) em relação aos contrastes independentes das fêmeas (PICs) do tamanho médio do tórax das espécies dos quatro clados subordinados a Muscidae. A linha escura representa modelo isométrico ( $\beta=1$ ) e linha vermelha representa o ajuste do modelo RMA com intervalo de confiança de 95% (linhas tracejadas) . . . . . 37

**Figura 8** – Reconstrução dos caracteres ancestrais do tamanho de fêmeas e machos e do dimorfismo sexual do tamanho das espécies de Muscidae. Escala de tamanho de machos e fêmeas em milímetros. A escala do dimorfismo sexual do tamanho indica a proporção que um sexo é maior que o outro, onde valores positivos indicam dimorfismo enviesado para fêmeas e valores negativos indicam dimorfismo enviesado para machos. . . . . 41

## RESUMO

ISOMETRIA DO DIMORFISMO SEXUAL DO TAMANHO EM MUSCIDAE. A regra de Rensch prediz que o nível de dimorfismo sexual do tamanho (SSD - “*Sexual Size Dimorphism*”) aumenta em espécies cujos machos são maiores e diminui em espécies cujas fêmeas são maiores com o aumento do tamanho do corpo, sendo que esse padrão é gerado por uma variação maior do tamanho dos machos. Apesar da regra de Rensch ser considerada uma regra geral para os animais, os resultados em relação aos insetos são conflitantes com padrões alométricos inconsistentes e variados. Nesse contexto, a evolução e covariação do tamanho e SSD foi analisada em dípteros da família Muscidae utilizando métodos filogenéticos comparados. Especificamente as seguintes questões foram investigadas: 1) O tamanho e SSD covariam alometricamente em Muscidae? 2) Qual sexo prediz a evolução do padrão de covariação do tamanho e do SSD? 3) O tamanho de machos e fêmeas evoluem por um processo neutro ou seletivo? 4) A evolução do tamanho de machos e fêmeas está relacionada com a evolução do SSD? A alometria do SSD foi analisada através de regressão do Eixo Maior Reduzido utilizando os contrastes filogenéticos independentes de Felsenstein calculados a partir do tamanho do tórax de machos e fêmeas de 132 espécies de Muscidae. As análises também foram realizadas em quatro clados subordinados de Muscidae. A evolução do tamanho e do SSD em Muscidae foi analisada através do ajuste de modelos de evolução de caráter, neutral e seletivo, e da reconstrução dos caracteres ancestrais. Muscidae possui uma sutil tendência de dimorfismo enviesado para fêmeas, no entanto, tanto dimorfismo enviesado para fêmeas quanto para machos ocorre em linhagens dessa família. Além disso, Muscidae demonstra um padrão isométrico de SSD, sendo que o tamanho dos machos e das fêmeas evolui na mesma taxa, indicando que ambos os sexos contribuem para evolução do SSD. Esse padrão isométrico também foi observado em níveis hierárquicos menores dentro de Muscidae. A evolução do tamanho de ambos os sexos segue um modelo de seleção estabilizadora, indicando que processos seletivos atuam em ambos os sexos. O padrão isométrico do SSD em Muscidae e a quebra da regra de Rensch em outros grupos de animais foram discutidos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Alometria; contrastes filogenéticos independentes; Diptera; Métodos Filogenéticos Comparativos; regra de Rensch.

## ABSTRACT

ISOMETRY FOR SEXUAL SIZE DIMORPHISM IN THE MUSCIDAE. Rensch's rule predicts that the level of sexual dimorphism size (SSD) increases with overall body size in species where males are the larger sex, and decreases with body size in species where females are the larger sex and this pattern is generated by a wider variation in the size of males. Although the Rensch's rule is considered a general rule for the animals, the results regarding insects are conflicting with inconsistent and varied allometric patterns. In this context, evolution and covariation of size and SSD was analyzed in flies of the Muscidae Family using compared phylogenetic methods. Specifically, the following questions were investigated: 1) Do size and SSD covary through an allometric relationship in Muscidae? 2) Which sex guides the evolution of the covariation pattern for size and SSD? 3) Does the size of males and females evolve through a neutral or selective process? 4) Is the evolution of size of males and females related to the evolution of the SSD? The SSD allometry was analyzed through a Reduced Major Axis regression using Felsenstein's phylogenetic independent contrasts calculated from the thorax size of males and females of 132 species of Muscidae. Analyses were also performed in four monophyletic clades subordinate to Muscidae. The evolution of size and SSD in Muscidae was analyzed through fitting models of character evolution, neutral and selective, and reconstruction of ancestral characters. Muscidae has a subtle trend towards a female-biased SSD, although both female-biased and male-biased SSD occur in the group. Moreover, Muscidae follows a pattern of isometry of the SSD, with the body size of males and females changing at the same rate, such that both sexes influence the evolution of SSD equally. The isometric pattern was also observed at lower hierarchical levels within Muscidae. The evolution of the size of both sexes follows a stabilizing selection model, indicating that selective processes act in both sexes. The isometric pattern of the SSD and the break of Rensch's rule in other groups of animals were discussed.

KEY WORDS: Allometry; Comparative Phylogenetic Methods; Diptera; phylogenetically independent contrasts; Rensch's rule.

## 1. INTRODUÇÃO

O tamanho do corpo é uma característica importante para os organismos porque é correlacionado com a sobrevivência e a reprodução, influenciando diretamente no valor adaptativo dos organismos (Fairbairn *et al.*, 2007). Nos animais, em geral, machos e fêmeas possuem tamanhos diferentes, sendo que em algumas espécies o tamanho de um sexo pode ser várias vezes o tamanho do outro (Abouheif & Fairbairn, 1997). Essa diferença de tamanho entre os sexos é denominada dimorfismo sexual no tamanho (SSD – “*Sexual Size Dimorphism*”). Embora a direção do SSD varia entre as espécies na maioria dos invertebrados e vertebrados ectotérmicos as fêmeas são maiores que os machos (dimorfismo enviesado para fêmeas), enquanto que na maioria dos vertebrados endotérmicos os machos são maiores que as fêmeas (dimorfismo enviesado para machos) (Abouheif & Fairbairn, 1997; Fairbairn *et al.*, 2007).

A evolução do SSD é um tópico da biologia evolutiva que motivou muitas discussões nas últimas décadas (Fairbairn, 1997; Fairbairn *et al.*, 2007). Usualmente, as explicações se relacionam a hipóteses de que o SSD pode ser gerado pela adaptação aos diferentes papéis reprodutivos ou por diferenças ecológicas entre os sexos (Fairbairn *et al.*, 2007; Punzalan & Hosken, 2010). A ideia mais comum é que o dimorfismo sexual no tamanho é gerado pela adaptação aos diferentes papéis reprodutivos que machos e fêmeas desempenham (Fairbairn *et al.*, 2007). Nesse contexto, o tamanho está relacionado a fertilidade das fêmeas e com o sucesso de cópula nos machos. Assim, fêmeas maiores teriam maior fecundidade, maior potencial reprodutivo e poderiam alocar mais recursos para a prole (Stephens & Wiens, 2009; Ceballos *et al.*, 2012). Por outro lado, a seleção sexual pode favorecer machos maiores devido às vantagens que esses machos possuem em relação a competições entre machos e pela corte à fêmea (Kraushaar & Blanckenhorn, 2002; Fairbairn *et al.*, 2007; Serrano-Meneses *et al.*,

2008). Dessa forma, o valor adaptativo máximo em relação ao tamanho do corpo difere entre os sexos, em resposta à seleção sexual que atua nos machos e à seleção de fecundidade que atua nas fêmeas (Fairbairn *et al.*, 2007; Stillwell *et al.*, 2010). Por outro lado, a diferença de tamanho entre machos e fêmeas pode refletir diferenças ecológicas entre os sexos, indicando que o SSD corresponde a uma adaptação a diferentes nichos ecológicos (segregação sexual) e não a diferentes papéis reprodutivos (Tubaro & Bertelli, 2003; Fairbairn *et al.*, 2007; Punzalan & Hosken, 2010). Essa hipótese implica que o SSD seja reflexo de uma partição intersexual do nicho, reduzindo assim a competição intraespecífica entre os sexos (Serrano-Meneses *et al.*, 2008; Stephens & Wiens, 2009; Punzalan & Hosken, 2010). Apesar da ideia de que o SSD seja gerado pelas diferenças ecológicas entre os sexos venha sendo novamente debatida nos últimos anos (e.g. Punzalan & Hosken, 2010), ainda não está claro se as diferenças ecológicas entre os sexos podem causar a evolução do dimorfismo sexual do tamanho.

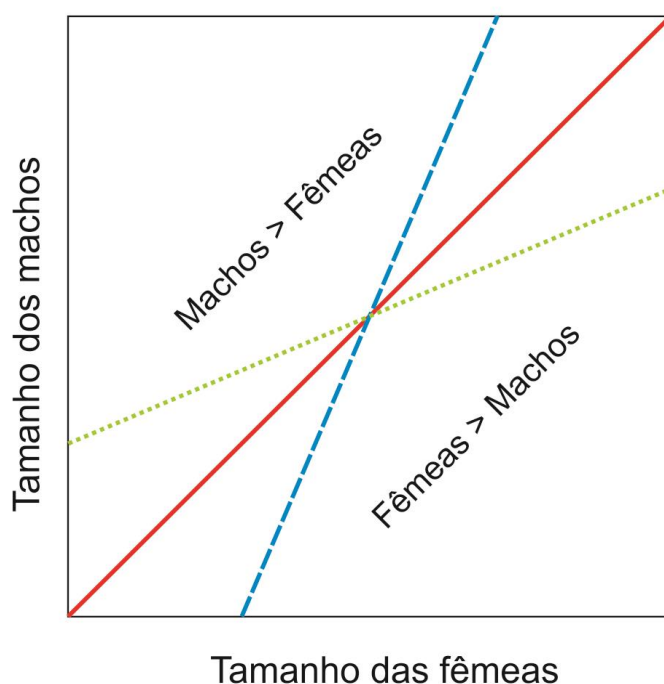
Uma relação alométrica é caracterizada por diferenças das proporções em relação a mudanças na magnitude total de um organismo (Fairbairn, 1997). Relações alométricas são quantificadas usando a função  $y = \alpha x^\beta$ , onde  $x$  é o tamanho do corpo,  $y$  é a medida da característica em interesse, e  $\alpha$  e  $\beta$  são constantes. Se  $x$  e  $y$  são medidos na mesma escala, a razão  $y/x$  será constante quando  $\beta=1$ , caracterizando assim uma similaridade geométrica ou isometria. Dessa forma, a alometria somente ocorre quando  $\beta \neq 1$ . Nesse caso, se  $\beta > 1$ , o valor de  $y$  aumenta em uma proporção maior que o valor de  $x$ , e  $y/x$  aumenta com o aumento de  $x$ . Esse cenário é denominado de alometria positiva ou hiperalometria. No entanto, quando  $\beta < 1$ , o valor de  $y$  aumenta em uma proporção menor que o valor de  $x$ , e  $y/x$  declina com o aumento de  $x$ , caracterizando um cenário de alometria negativa ou hipoalometria. Para quantificar a alometria é necessário estimar o valor do coeficiente alométrico  $\beta$ , e isso é realizado através da transformação

logarítmica da função alométrica,  $\log(y) = \log(\alpha) + \beta \log(x)$ , sendo agora  $\beta$  o coeficiente de inclinação de uma regressão linear (Fairbairn, 1997).

Nos últimos anos aumentaram os testes da relação alométrica entre tamanho e SSD, descrita como Regra de Rensch (Fairbairn & Preziosi, 1994; Abouheif & Fairbairn, 1997; Tubaro & Bertelli, 2003; Blanckenhorn *et al.*, 2006; Blanckenhorn *et al.*, 2007; Webb & Freckleton, 2007; Serrano-Meneses *et al.*, 2008; Herczeg *et al.* 2010, Ceballos *et al.*, 2012; Halámková *et al.*, 2012, Bidau *et al.*, 2013; Liao *et al.*, 2013). A regra de Rensch descreve um padrão alométrico em que o SSD aumenta em relação ao tamanho em espécies cujo o dimorfismo é enviesado para os machos e decresce em espécies cujo o dimorfismo é enviesado para as fêmeas devido à variação maior no tamanho dos machos do que no tamanho das fêmeas (Fairbairn & Preziosi, 1994). Em um panorama evolutivo, a regra de Rensch assume que a seleção do tamanho dos machos em combinação com uma alta correlação genética no tamanho entre os sexos pode ser considerada como o principal fator que determina o padrão alométrico do SSD (Fairbairn & Preziosi, 1994; Fairbairn, 1997; Blanckenhorn *et al.*, 2006; Blanckenhorn *et al.*, 2007). Assim, um aumento ou uma redução no tamanho dos machos em resposta à seleção sexual gera uma resposta correlacionada, mas em menor magnitude, no tamanho das fêmeas (Fairbairn *et al.*, 2007). Desse modo, o tamanho evolui na mesma direção, mas em diferentes taxas entre os sexos, gerando assim, uma covariância entre os sexos e, conseqüentemente, entre o tamanho médio e o SSD (Fairbairn & Preziosi, 1994; Blanckenhorn *et al.*, 2006).

Uma forma de testar a regra de Rensch é pelo modelo de análises alométricas, utilizando modelos de regressão, onde o tamanho de um sexo é plotado em relação ao tamanho de outro sexo em uma escala logaritmizada e as inclinações são analisadas (Fairbairn & Preziosi, 1994; Fairbairn, 1997; Blanckenhorn *et al.*, 2007). Quando os

machos são plotados no eixo y, a regra de Rensch pode ser confirmada estatisticamente por uma hiperalometria ou uma alometria positiva, onde  $\beta > 1$  (Figura 1). Dessa forma, um resultado que indica uma hiperalometria infere que o tamanho dos machos (plotado no eixo y) varia mais que o tamanho das fêmeas (plotado no eixo x), confirmando assim as previsões da regra de Rensch (Fairbairn & Preziosi, 1994; Blanckenhorn *et al.*, 2007).). Um resultado contrário (hipoalometria, onde  $\beta < 1$ ) significa que o grau de SSD não segue um modelo contrário a regra de Rensch. Uma isometria ( $\beta = 1$ ) significa que o SSD não varia alometricamente com o tamanho do corpo.



**Figura 1** – Modelo de regressão para estimar a alometria do dimorfismo sexual do tamanho. A linha diagonal sólida (vermelha) representa um modelo isométrico ( $\beta = 1$ ). SSD enviesado para machos é representado acima da linha diagonal sólida e SSD enviesada para fêmeas é representada abaixo da linha diagonal sólida. A linha pontilhada (verde) representa uma hipoalometria ( $\beta < 1$ ) do SSD, onde o tamanho das fêmeas varia mais que o tamanho dos machos. A linha tracejada (azul) representa uma hiperalometria ( $\beta > 1$ ) do SSD, onde o tamanho dos machos varia mais que o tamanho das fêmeas, sendo assim consistente com a regra de Rensch. Figura adaptada de Fairbairn (1997).

Apesar do grau de dimorfismo no tamanho (SSD) estar relacionado alometricamente com a variação do tamanho do corpo (Fairbairn & Preziosi, 1994, Serrano-Meneses *et al.*, 2008; Stephens & Wiens, 2009; Frýdlová & Frynta, 2010), as evidências em favor da regra de Rensch são incongruentes entre táxons (Blanckenhorn *et al.*, 2007; Ceballos *et al.*, 2012). Na maioria dos grupos em que os machos são maiores, ou seja, grupos em que o SSD é enviesada para os machos, o padrão alométrico do dimorfismo segue a regra de Rensch (Abouheif & Fairbairn 1997). No entanto, há uma grande inconsistência nos resultados em grupos cujas fêmeas são maiores (Tubaro & Bertelli, 2003; Webb & Freckleton, 2007; Serrano-Meneses *et al.*, 2008; Ceballos *et al.*, 2012; Liao *et al.*, 2013).

Nos insetos existem muitos resultados conflitantes em relação à regra de Rensch, sendo que os padrões alométricos são inconsistentes e variados entre os grupos (Kraushaar & Blanckenhorn, 2002; Blanckenhorn *et al.*, 2007, Blanckenhorn *et al.*, 2007b; Serrano-Meneses *et al.*, 2008; Bidau *et al.*, 2013). Nesse contexto, Blanckenhorn *et al.* (2007) testaram as premissas da regra de Rensch em sete táxons de insetos e observaram que esse padrão alométrico ocorre somente em três táxons, sugerindo que esta regra não é um padrão geral para os insetos. Além de uma variação em grande escala, o padrão alométrico do SSD também pode ser inconsistente entre os diferentes níveis taxonômicos de um grupo (Serrano-Meneses *et al.*, 2008; Stephens & Wiens, 2009; Ceballos *et al.*, 2012). Serrano-Meneses *et al.* (2008), testaram a adequação a regra de Rensch em Odonata e observaram que a ordem exibe um padrão alométrico do dimorfismo consistente com a regra de Rensch, embora as subordens apresentaram resultados contrastantes. A subordem Zygoptera, cujos machos são maiores, demonstrou um padrão de alometria consistente com a regra de Rensch enquanto a subordem Anisoptera, cujas fêmeas são maiores, apresentou um padrão



isométrico do SSD (Serrano-Meneses *et al.*, 2008). Assim, estudos com enfoques evolutivos em vários níveis podem auxiliar no entendimento dos padrões de SSD encontrado nos insetos. Nesse contexto, nós investigamos a relação do tamanho com o SSD em Muscidae (Diptera: Insecta). Muscidae é um grupo monofilético com mais de 4000 espécies, sendo que, cerca de 840 ocorrem na Região Neotropical e estão distribuídas em 84 gêneros (Carvalho, 2002). Muscidae é um bom modelo de estudo devido a: (1) a ocorrência de SSD nas espécies; (2) Apesar de não haver uma filogenia para a família em nível específico, existe uma *supertree* com terminais em nível de gênero (Lowenberg-Neto *et al.*, 2011) e hipóteses filogenéticas em níveis específicos para subfamília, tribos e gêneros (3) As informações morfológicas podem ser obtidas através da análise direta dos exemplares depositados nas coleções entomológicas; (4) Como não possuem crescimento no estágio adulto, o tamanho dos adultos pode ser estimado com maior confiabilidade em relação a outros grupos de animais.

Nesse estudo foi analisada a evolução e covariação do tamanho e SSD de Muscidae utilizando métodos filogenéticos comparativos. O tamanho e o SSD podem covariar assumindo os seguintes cenários evolutivos: 1) o tamanho dos machos pode variar mais que o tamanho das fêmeas ao longo da evolução gerando um padrão alométrico consistente com a regra de Rensch onde o SSD aumenta em espécies cujos machos são maiores e diminui em espécies cujas fêmeas são maiores em relação ao aumento do tamanho; 2) O tamanho das fêmeas pode variar mais que o tamanho dos machos ao longo da evolução do grupo gerando um modelo contrário ao modelo descrito pela regra de Rensch (“*converse Rensch’s rule*”). Nesse caso o dimorfismo diminui em espécies cujos machos são maiores e aumenta em espécies cujas fêmeas são maiores com o aumento do tamanho do corpo; 3) Em um terceiro cenário, os tamanhos de machos e fêmeas podem variar na mesma taxa ao longo do tempo influenciado

igualmente no SSD. Nesse caso, o tamanho de machos e fêmeas pode estar evoluindo neutralmente em um processo de deriva, não assumindo nenhuma direção em particular. Uma segunda possibilidade é que múltiplas forças evolutivas, como seleção sexual nos machos, seleção da fecundidade nas fêmeas ou seleção natural, podem estar atuando na mesma intensidade entre os sexos afetando a evolução do SSD sem tendência alométrica.

## 2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo principal determinar o cenário evolutivo que melhor explica a covariação do tamanho e SSD das espécies de Muscidae. Especificamente as seguintes questões foram investigadas:

- 1) O tamanho e o SSD covariam alometricamente em Muscidae?
- 2) Qual sexo prediz a evolução do padrão de covariação do tamanho e do SSD?
- 3) O tamanho de machos e fêmeas evoluem por um processo neutro ou seletivo?
- 4) A evolução do tamanho de machos e fêmeas está relacionada com a evolução do SSD?

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Amostragem

Foram medidos 6383 exemplares de Muscidae pertencentes a 226 espécies alocados em 57 gêneros. Os exemplares analisados pertencem a Coleção Entomológica Pe. Jesus Santiago Moure (DZUP, Curitiba, PR) e a Coleção de Diptera do Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ, Rio de Janeiro, RJ). O tamanho total do corpo foi estimado pelo comprimento do tórax, uma medida linear que inicia no protórax e se estende até a parte posterior do escutelo (Figura 2). Essa estimativa foi escolhida porque o comprimento do tórax é uma medida representativa do tamanho geral do corpo (Fairbairn, 1997; 2007) e possui pouca deformação quando comparado com o abdome. Além disso, o tórax é a estrutura mais preservada nos exemplares em coleções entomológicas, já que as demais estruturas, principalmente os apêndices, podem estar danificadas ou ausentes, devido ao manuseio durante a coleta e montagem ou devido ao mal estado de preservação de alguns espécimes.



**Figura 2** – Representação da medida geral do comprimento total do tórax (linha tracejada) dos exemplares de Muscidae analisados. Imagem parcial de uma fêmea de *Charadrella malacophaga* Lopes, 1938.

As imagens dos exemplares de Muscidae foram obtidas através de um sistema de imagem portátil (microscópio digital Dino-Lite Pro/AM413T – [www.dinolite.com.br](http://www.dinolite.com.br)) acoplado a um suporte fixo conectado diretamente ao computador. No início de cada sessão de captura de imagens foi obtida a imagem de uma escala milimétrica para conversão do tamanho. As medidas das imagens dos exemplares (tamanho do tórax) foram obtidas utilizando o programa TPSdig2 (Rohlf, 2005). A distância e a posição do sistema de imagens em relação ao exemplar foram padronizadas de forma a reduzir ao máximo o erro de obtenção das imagens e medidas conforme detalhes apresentados no Anexo I.

Como o tamanho amostral de machos e fêmeas variou entre as espécies, a influência do tamanho amostral em relação ao SSD foi analisada através de uma regressão do tamanho amostral de machos e fêmeas em relação ao valor absoluto do índice de dimorfismo sexual do tamanho (SDI – “*Sexual dimorphism index*”) de Lovich-Gibbons (Lovich & Gibbons, 1992). O intuito dessa análise é determinar se espécies com tamanho amostral pequeno possuem valores altos de SDI e consequentemente possam gerar um viés nas análises posteriores. O SDI foi calculado da seguinte maneira:

$$SDI = L/S - 1 \quad (1)$$

Onde L é o tamanho médio do sexo maior e S é o tamanho médio do sexo menor. Este índice é definido como positivo quando as fêmeas são maiores e negativo quando os machos são maiores (Lovich & Gibbons, 1992). O índice de Lovich-Gibbons é um bom estimador do dimorfismo sexual do tamanho (Fairbairn, 1997; Blanckenhorn *et al.*, 2007; Fairbairn *et al.*, 2007; Stephens & Wiens, 2009), sendo amplamente utilizado por ser: (1) linear - ao dobrar a magnitude do SSD também dobra o valor do índice; (2) simétrico - machos duas vezes maiores que as fêmeas ou fêmeas duas vezes

maiores que os machos demonstram valores equidistantes do valor neutro (zero); (3) direcional - o sinal do índice indica qual sexo é o maior, e (4) intuitivo - a magnitude e a direção do dimorfismo são facilmente interpretadas.

Foram mantidas nas análises somente as espécies com pelo menos quatro exemplares por sexo, por ser o menor tamanho amostral sem viés com a magnitude do SSD (Fêmeas:  $R^2 = 0,01$ ; GL = 129; P = 0,26. Machos:  $R^2 = 0,02$ ; GL = 129; P = 0,07). A espécie *Biopyrellia bipuncta* (Wiedemann, 1830) foi retirada dessas análises por ter um tamanho amostral muito maior do que as demais espécies, evitando assim um viés causado por uma única amostra.

Assim, foram analisadas 132 espécies pertencentes a 39 gêneros com tamanho amostral médio de  $20,4 \pm 11,2$  (variando entre 4 e 87 – valor mínimo e máximo) exemplares para fêmeas e  $18,3 \pm 10,4$  (variando entre 4 e 71) exemplares para machos. A tabela com tamanho amostral, a média e o desvio padrão do tamanho do tórax de machos e fêmeas e o índice de dimorfismo sexual do tamanho (SDI) de cada espécie de Muscidae analisada está no Anexo II.

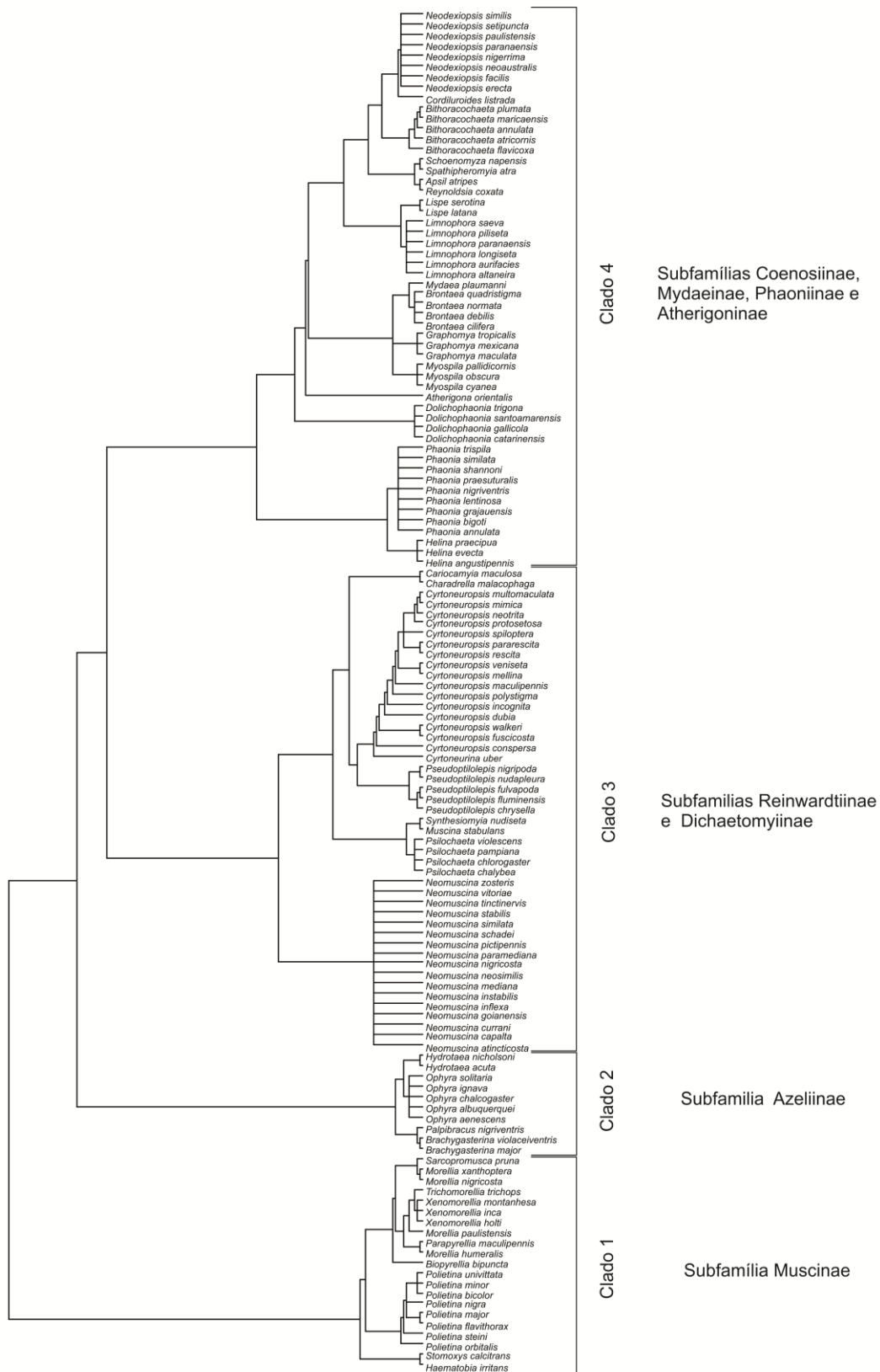
### 3.2. Filogenia composta de Muscidae

Como ainda não há uma filogenia que possua todas as espécies analisadas neste trabalho, foi construída uma filogenia composta de Muscidae. A base dessa filogenia foi a *supertree* de Muscidae com 128 táxons terminais em nível de gênero (Löwenberg-Neto *et al.*, 2011). A partir deste cenário base, a cada terminal de gênero da *supertree* foram adicionadas manualmente as filogenias que possuem espécies como táxons terminais. No caso de gêneros sem hipótese filogenética, todas as espécies foram

alocadas no ramo terminal como uma politomia. A filogenia composta de Muscidae foi podada de forma a incluir somente as espécies analisadas (Figura 2, Anexo III).

Carvalho (2002) distribuiu a fauna neotropical de Muscidae em sete subfamílias: Atherigoninae (com um único gênero), Muscinae, Azeliinae, Phaoniinae, Cyrtoneurinae, Mydaeinae e Coenosiinae. Apesar da monofilia de Muscidae ser bem suportada, a monofilia das subfamílias de Muscidae atualmente vem sendo contestada (Carvalho, 2002; Schuehli *et al.*, 2007; Lowenberg-Neto *et al.*, 2011). Dessa forma, a árvore composta foi dividida em 4 clados subordinados (Figura 3), sendo que o Clado 1 é formado por 21 espécies pertencente a 9 gêneros da subfamília Muscinae, o Clado 2 é formado por 10 espécies pertencentes a 4 gêneros da subfamília Azeliinae, o Clado 3 formado por 47 espécies pertencentes a 9 gêneros das subfamílias Reinwardtiinae e Dichaetomyiinae e o clado 4 é formado por 54 espécies pertencentes a 17 gêneros das subfamílias Coenosiinae, Mydaeinae, Phaoniinae e Atherigoninae. A nomenclatura utilizada para as famílias segue o trabalho de Lowenberg-Neto *et al.* (2011).

O comprimento dos ramos da filogenia foi gerado através do Método de Grafen (Grafen, 1989). O procedimento implica na atribuição para cada nó de um valor (“peso”) que corresponde ao número de terminais do ramo menos um. Para os terminais é atribuído um valor de zero. Cada valor é escalonado de tal forma que o peso na raiz seja um (1,0) e então o valor é elevado a potencia ‘rho’ ( $=1$ ). O comprimento do ramo é dado pela diferença entre o peso dos nós inferior e superior. Um valor de rho abaixo de um comprime os ramos próximos à base e expande os ramos superiores da filogenia, enquanto um valor de rho maior do que um modifica a filogenia no sentido contrário (Grafen, 1989).



**Figura 3** – Filogenia composta contendo as 132 espécies de Muscidae analisada. As informações na lateral da filogenia indicam os quatro clados subordinados de Muscidae e as famílias pertencentes a cada clado utilizado nas análises.



### 3.3. Cálculo dos contrastes filogenéticos independentes de Felsenstein (PICs – “Phylogenetic independent contrasts”)

A ideia da evolução do dimorfismo é formulada em um contexto evolutivo e, portanto, os testes devem ser conduzidos com base em um cenário de relações filogenéticas que forneçam essa hierarquia temporal (Abouheif & Fairbairn, 1997; Fairbairn *et al.*, 2007; Ceballos *et al.*, 2012). Neste arcabouço evolutivo, as espécies não podem ser consideradas como pontos independentes de amostragem porque possuem uma história evolutiva compartilhada, sendo assim auto-correlacionadas (Felsenstein, 1985). Portanto, é pré-requisito para o teste destes padrões que a história evolutiva seja levada em conta, através da utilização de métodos filogenéticos comparativos (Abouheif & Fairbairn, 1997).

Nesse contexto, o método de contrastes filogenéticos independentes (PICs – “Phylogenetic Independent Contrasts”) de Felsenstein (Felsenstein, 1985) resolve o problema da falta de independência dos dados. O método de Felsenstein é utilizado para analisar a correlação evolutiva entre caracteres quantitativos e os padrões de divergência dos mesmos (Diniz-Filho, 2000). Felsenstein (1985) propôs que a diferença entre os valores de uma característica entre pares de espécies depende apenas do tempo de divergência entre essas espécies, assumindo que a evolução do caráter tenha ocorrido por movimento Browniano. Os contrastes independentes são calculados ao longo da filogenia iniciando no ápice e seguindo em direção à raiz. Cada contraste é a diferença no fenótipo entre um par de espécies ou entre valores ancestrais dessas espécies (nós da filogenia) e como essa diferença depende somente do tempo de divergência entre esses pares, ele é independente (Felsenstein, 1985; Garland *et al.*, 1992; Diniz-Filho, 2000). No entanto, é esperado que quanto maior seja o tempo de divergência entre as espécies, maior seja a diferença entre elas, gerando assim altos valores de contrastes. Para corrigir

esse efeito os contrastes independentes podem ser padronizados dividindo o valor de cada contraste pelo seu desvio padrão (raiz quadrada da soma do tamanho dos ramos) (Felsenstein, 1985; Garland *et al.*, 1992). A adequação da padronização dos contrastes pode ser testada pela análise de correlação dos valores absolutos dos contrastes padronizados versus os desvios padrões dos contrastes, conforme descrito por Garland *et al.* (1992). De acordo com Garland *et al.* (1992), esse procedimento equivale a plotar qualquer razão versus o seu denominador para determinar se o efeito de escala do denominador foi efetivamente removido. Uma correlação significativa entre os contrastes e os desvios padrões indica que a padronização não é adequada. Nesses casos, transformações dos dados ou dos tamanhos dos ramos devem ser realizadas e a correlação deve ser novamente testada (Garland *et al.*, 1992).

Existem várias formas de tratar as politomias em relação à análise de contrastes. Felsenstein (1985) sugere que politomias reais (“hard”), que são reflexo de uma radiação adaptativa, sejam transformadas em uma série de dicotomias aleatorizadas com comprimentos de ramos na ordem zero. Para cada dicotomia um contraste é calculado e padronizado para a unidade de variância, dividindo-o pela raiz quadrada da soma dos seus comprimentos, sendo por fim calculados  $N-1$  contrastes. A maneira pela qual os ramos dentro da politomia são resolvidos não tem nenhum efeito sobre os cálculos dos contrastes independentes (Purvis & Garland, 1993). No entanto, o efeito da politomia deve ser levado em consideração nos cálculos dos graus de liberdade nos testes de hipótese. Purvis & Garland (1993) sugerem que os testes de hipótese tenham um número de graus de liberdade máximo de  $N - 2$  ou número de contrastes menos um ( quando todas as politomias são ‘hard’) e mínimo de  $P - 1$  (número de nós reais menos um, ou valor de um no caso especial de uma filogenia em forma de estrela ), quando as politomias são “soft” (note que  $P - 1 = N - 2 - z$ , onde  $z$  é numero de ramos com

comprimento zero). Assim, quando a filogenia possui somente politomias “hard” o teste deve ser mais liberal com  $N - 2$  graus de liberdade, no entanto quando a filogenia apresenta politomias “soft” um teste mais conservativo deve ser realizado utilizando  $P - 1$  graus de liberdade (Purvis & Garland, 1993; Garland & Diaz-Uriarte, 1999).

Como as politomias da filogenia composta de Muscidae são resultado do não conhecimento das relações filogenéticas entre as espécies, elas foram tratadas como politomias soft. Assim, as politomias foram resolvidas aleatoriamente sendo transformadas em uma série de dicotomias com comprimento de ramo zero. Foram calculados  $n-1$  contrastes padronizados pelo desvio padrão. Ao analisar o ajuste da padronização dos contrastes foi encontrada uma correlação negativa significativa entre os PICs e os desvios padrões dos PICS (Fêmeas:  $r = -0,32$ ;  $P < 0,001$ . Machos:  $r = -0,32$ ;  $P < 0,001$ ) indicando que a padronização não foi adequada. Segundo Garland *et al.* (1992) uma correlação negativa pode ser tratada logaritimizando os comprimentos de ramos na base 10, “encurtando” assim ramos longos (reduzindo o desvio padrão) em relação a ramos curtos. Devido ao fato do valor dos comprimentos de ramos serem menores do que um (1,0) todos os valores foram multiplicados por 1000 e depois logaritimizados para evitar tamanhos de ramos negativos. A correlação entre os PICs e os desvios padrões dos PICs não foi significativa após a transformação dos comprimentos de ramos (Fêmeas:  $r = -0,10$ ;  $P = 0,24$ . Machos:  $r = -0,06$ ;  $P = 0,51$ ), indicando que a padronização dos contrastes foi adequada.

A manipulação da filogenia e a computação dos PICs foi realizada através dos pacotes “ape” 3.0.8 (Paradis *et al.*, 2004) e “geiger” 1.3.1 (Harmon, 2008) no ambiente R 2.15.1 (R Development Core Team, 2012).

### 3.4. Alometria do dimorfismo sexual do tamanho em *Muscidae*

A alometria do dimorfismo sexual foi testada através de uma análise de regressão por Eixo Maior Reduzido (RMA, “*Reduced Major Axis*”) passando pela origem. Nessa regressão, os contrastes independentes do tamanho do copo dos machos foram ajustados em função dos contrastes independentes do tamanho do corpo das fêmeas. A RMA é uma análise de regressão do tipo II e é a mais apropriada para análise da alometria do SSD porque as medidas tanto da variável preditora quanto da regressora ( $x$  e  $y$ ) possuem erros associados (Fairbairn, 1997; Blanckenhorn *et al.*, 2007). A regressão passando pela origem é necessária devido à ambiguidade do cálculo dos contrastes (Garland *et al.*, 1992). Os PICs são calculados através da subtração das variáveis entre dois terminais/nós e a direção dessa subtração é arbitrária, portanto o sinal do contraste depende da direção da subtração. Essa ambiguidade do sinal afeta o intercepto, mas não altera o coeficiente angular da reta. Devido a essa ambiguidade, Garland *et al.* (1992) sugere que nas representações gráficas os contrastes negativos plotados no eixo horizontal ( $x$ ) sejam rotacionados de forma que esses valores sejam positivos. Assim, se  $x$  é negativo e  $y$  é negativo, ambos são convertidos em valores positivos. No entanto, se  $x$  é negativo e  $y$  é positivo,  $x$  é convertido em valores positivos e  $y$  convertido em valores negativos.

Para testar se o coeficiente de regressão  $\beta$  é isométrico ( $\beta = 1$ ) ou alométrico ( $\beta \neq 1$ ) foi calculado o intervalo de confiança (IC) de 95% do coeficiente de regressão. Uma relação alométrica negativa entre o tamanho do corpo de machos e fêmeas é indicada por um limite superior do intervalo de confiança menor do que um (1,0). Um coeficiente de regressão com um intervalo de confiança que inclua o valor de um indica uma relação isométrica, enquanto um limite inferior do IC maior que um indica uma relação alométrica positiva (conforme a regra de Rensch). O IC do coeficiente de

regressão foi calculado com os graus de liberdade ajustados para o valor de  $N - 2 - z$  ( $z$  é o número de ramos com comprimento zero).

Além da hipótese geral para a família, a alometria do SSD também foi testada nos quatro clados subordinados à Muscidae (Figura 2), investigando assim se o padrão de covariação do tamanho e da SSD de Muscidae é consistente em clados menores e se existe um efeito de escala no grau de covariação do SSD.

Para realizar as análises de regressão do tipo II (RMA) foi escrita uma rotina de análise (“script”) no ambiente R 2.15.1 (R Development Core Team, 2012) utilizando as equações apresentadas no trabalho de Garland *et al.* (1992). A função RMA utilizada está descrita no Anexo IV.

Espécies com valores discrepantes (*outliers*) de tamanho podem afetar os cálculos dos PICS (Garland *et al.*, 1992) e consequentemente o coeficiente angular da regressão. A presença de outliers foi analisada através de gráficos boxplots do tamanho de machos e fêmeas. Espécies com tamanho menor que o primeiro quartil menos 1,5 vezes o intervalo interquartis (terceiro quartil menos o primeiro quartil) e espécies maiores que o terceiro quartil mais 1,5 vezes o intervalo interquartis foram considerados *outliers*. Para analisar o real efeito dos *outliers*, as análises foram novamente realizadas sem essas espécies e os valores do coeficiente angular e do IC foram comparados com os resultados anteriores. As análises alométricas também foram realizadas utilizando o tamanho de machos e fêmeas logaritimizado e, do mesmo modo, com todas as espécies amostradas (sem o corte amostral mínimo de quatro exemplares por sexo conforme descrito no item 3.1).

### 3.5. Medida da taxa de evolução do tamanho

Para testar qual sexo guia a evolução do SSD, a taxa de evolução do tamanho de fêmeas e machos de Muscidae foi comparada através do método proposto por Adams (2013). Este método gera dois modelos de evolução do caráter por Movimento Browniano: No primeiro cada característica evolui em uma taxa distinta; No segundo, as características são forçadas a evoluírem com a mesma taxa. Os valores de verossimilhança (likelihood) desses modelos são então comparados através do teste de razão de verossimilhança (LRT - likelihood ratio test), que é calculado da seguinte maneira:

$$LRT = 2(\ln L_1 - \ln L_0) \quad (2)$$

Onde  $\ln L_1$  é o logaritmo natural do valor máximo de verossimilhança do modelo com maior número de parâmetros e  $\ln L_0$  é o logaritmo natural valor máximo de verossimilhança do modelo com menor número de parâmetros (hipótese nula). Quando os modelos são aninhados (a hipótese nula é um caso especial da hipótese alternativa), o LRT aproxima-se de uma distribuição de chi-quadrado ( $\chi^2$ ) com graus de liberdade igual a  $q$ , que é dado pela diferença no número de parâmetros entre os dois modelos (Posada & Crandall, 2001). A hipótese nula é rejeitada quando a verossimilhança do modelo mais complexo é significativamente maior que a verossimilhança do modelo mais simples (Johnson & Omland, 2004).

O erro padrão da média do tamanho de machos e fêmeas foi incorporado nas estimativas da taxa de evolução do caráter como uma medida de erro intraespecífico. As análises foram realizadas no ambiente R 2.15.1 (R Development Core Team, 2012) utilizando o código fornecido por Adams (2013).

### 3.6. Ajustes dos modelos evolutivos

Para analisar se o tamanho de fêmeas e machos evolui por um processo neutro ou seletivo foram ajustados dois modelos de evolução de caráter para tamanho de machos e fêmeas: Modelo de Movimento Browniano (BM) e Modelo Ornstein–Uhlenbeck (O-U). O modelo BM descreve uma evolução neutra do caráter, onde em um espaço fenotípico as espécies evoluem aleatoriamente (Felsenstein, 1985). É dado pela seguinte expressão:

$$dX(t) = \sigma dB(t) \quad (3)$$

Onde  $dX(t)$  expressa a mudança infinitesimal no caráter  $X$  em relação ao infinitesimal aumento de tempo de  $t$  até  $t + dt$ . O termo  $dB(t)$  é a variável aleatória independente que assume uma distribuição normal com média zero e variância  $d(t)$  e o termo  $\sigma$  mede a intensidade de variação aleatória do processo evolutivo.

No modelo O-U o caráter evolui em direção a um pico adaptativo e estabiliza ao redor desse pico (Butler & King, 2004). O modelo OU é dado pela seguinte expressão:

$$dX(t) = \alpha [\theta - X(t)]dt + \sigma dB(t) \quad (4)$$

Onde o parâmetro  $\alpha$  mede a força de seleção. Quando o parâmetro  $\alpha = 0$ , a parte determinística do modelo OU é anulada e a equação é reduzida para o modelo BM. Na equação (2) a parte determinística do modelo OU é dada pela expressão:

$$\alpha [\theta - X(t)]dt \quad (5)$$

Essa expressão contém dois parâmetros:  $\alpha$ , que é a força de seleção, e  $\theta$ , o valor ótimo do modelo. A força de seleção é proporcional à distância da característica ao valor ótimo,  $\theta - X(t)$ . Assim, se o fenótipo está longe do ótimo, a força de seleção será

grande de forma a “puxar” a característica para o ótimo, enquanto que se o fenótipo estiver próximo ao ótimo, a força de seleção será fraca até que a variação aleatória afaste o fenótipo do ótimo ou haja uma mudança do valor ótimo ( $\theta$ ).

Como o modelo BM é um caso especial do modelo O-U, os modelos evolutivos foram comparados estatisticamente utilizando o teste de razão de verossimilhança (LRT) conforme equação 2, com uma distribuição aproximada de chi-quadrado com um grau de liberdade (diferença de parâmetros entre os modelos). Os modelos de evolução do caráter foram ajustados utilizando a função “fitContinuous” do pacote “geiger” 1.3.1 (Harmon, 2008) no ambiente R 2.15.1 (R Development Core Team, 2012).

Os modelos OU e BM também foram comparados utilizando a análise de Monte Carlo Filogenética (PMC - *Phylogentic Monte Carlo*) utilizando o pacote “pmc” (Boettiger *et al.*, 2012) no ambiente R 2.15.1 (R Development Core Team, 2012). No PMC, os dados foram simulados através da evolução de caráter por ambos os modelos 1000 vezes. Posteriormente, ambos os modelos foram ajustados a cada grupo de dados e o ajuste foi comparado através do teste de razão de verossimilhança (LRT). A frequência de LRT foi então plotada e comparada com o valor de LRT gerado pelo ajuste dos modelos nos dados de Muscidae.

### 3.7. *Reconstrução dos estados ancestrais de caracteres*

Para analisar como a evolução do tamanho de machos e fêmeas está relacionada com a evolução do SSD foi realizada a reconstrução dos estados de caracteres ancestrais do tamanho de fêmeas e machos e do SSD em Muscidae. Os estados ancestrais dos caracteres foram estimados utilizando máxima verossimilhança (Schluter *et al.*, 1997) e foram mapeados na filogenia de Muscidae plotando a estimativa do caráter ancestral

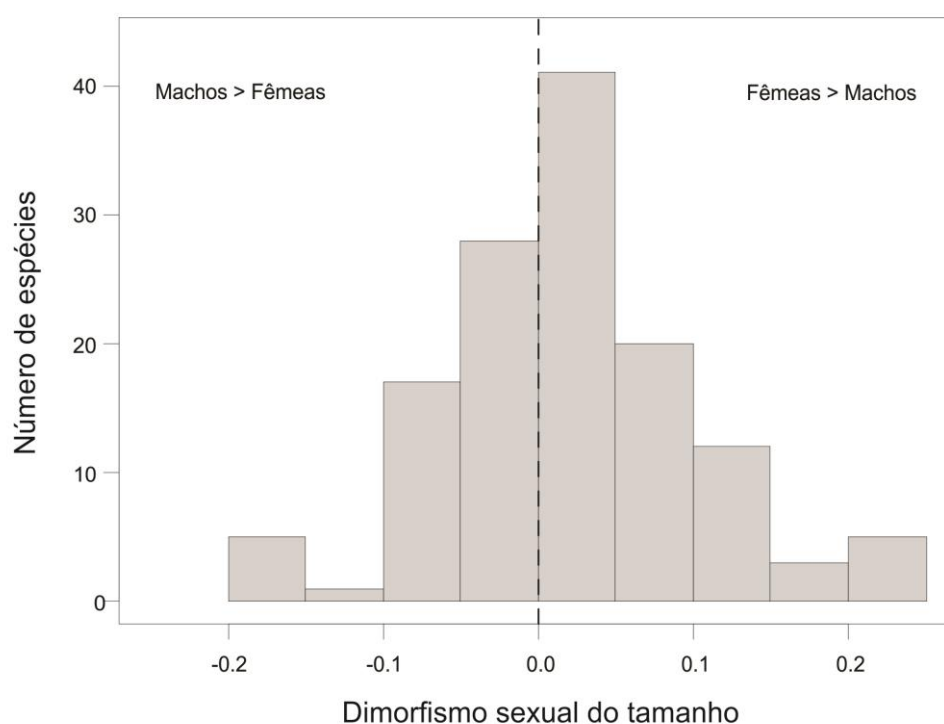


como um gradiente de densidade ao longo dos ramos da filogenia (Revell, 2013). O cálculo e o mapeamento dos caracteres ancestrais foram realizados utilizando a função “contMap” do pacote ‘phytools’ 0.2.90 (Revell, 2012) no ambiente R 2.15.1 (R Development Core Team, 2012).

## 4. RESULTADOS

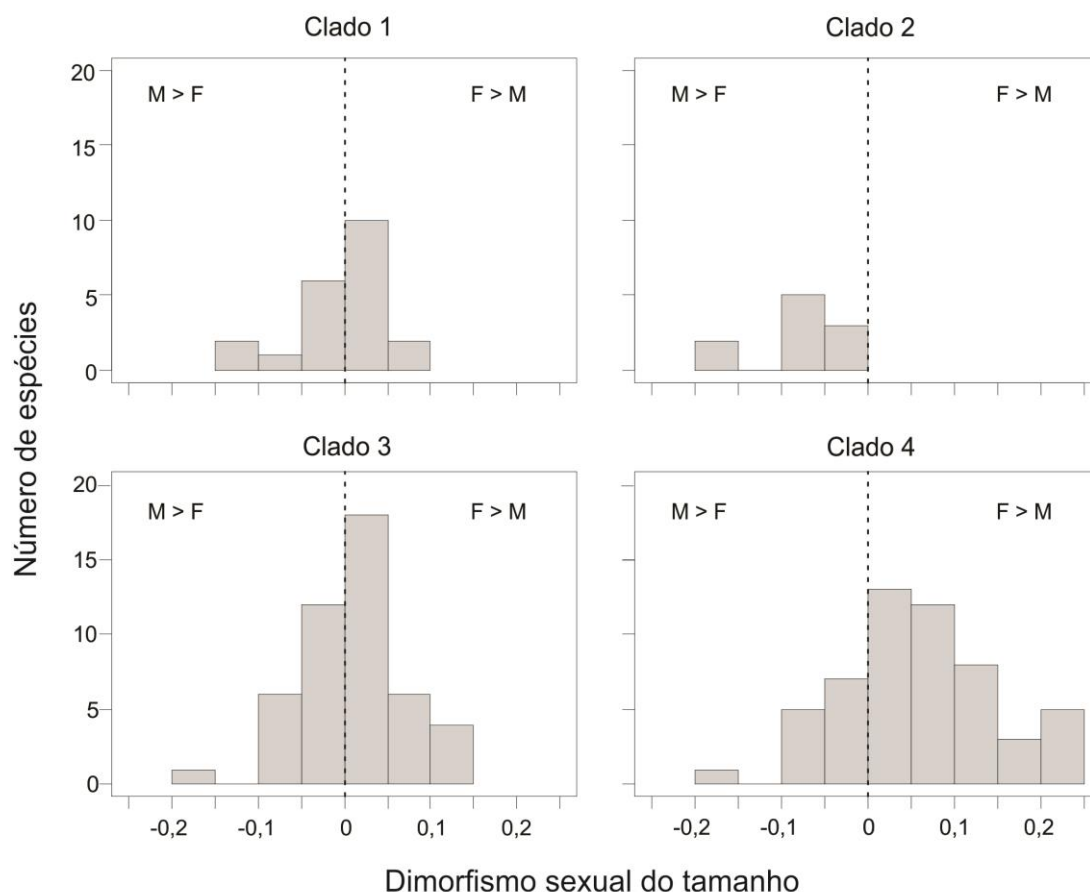
### 4.1. Descrição do dimorfismo sexual do tamanho em Muscidae

Em Muscidae ocorre tanto um dimorfismo enviesado para fêmeas (fêmeas>machos) quanto para machos (machos>fêmeas) (Figura 4). Embora sutil, o dimorfismo enviesado para fêmeas é predominante (SDI= 0,02 (-0,03; 0,07) (mediana, primeiro e terceiro quartil); Teste de Wilcoxon para uma amostra,  $W= 5536$ ,  $P< 0,001$ ). Apesar do tamanho variar em, aproximadamente, 4,5 vezes entre as espécies de Muscidae, o dimorfismo sexual não possui uma variação tão grande. Nas espécies onde o dimorfismo é enviesado para as fêmeas, essas são no máximo 24% maiores do que os machos, enquanto que, nas espécies com dimorfismo enviesado para machos, os machos são no máximo 18% maiores do que as fêmeas (Figura 4).



**Figura 4** – Distribuição do índice de dimorfismo sexual do tamanho (SDI) das espécies de Muscidae. Valores positivos indicam dimorfismo sexual do tamanho enviesado para fêmeas e valores negativos indicam um dimorfismo sexual do tamanho enviesado para os machos. Linha pontilhada indica valor zero de SDI.

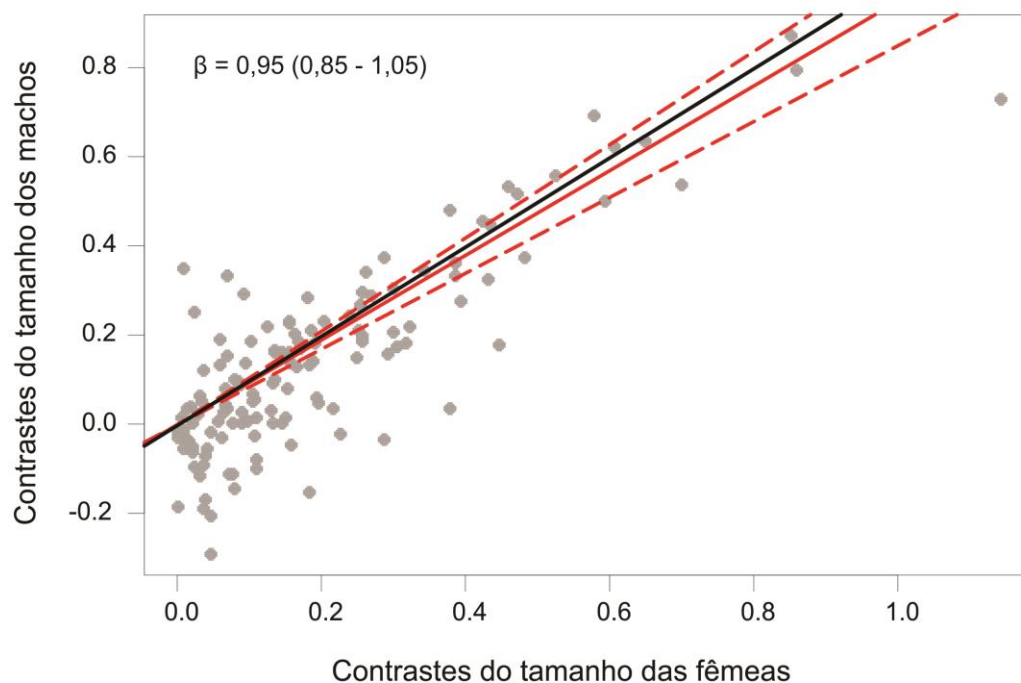
Com exceção do clado 2, os demais clados subordinados de Muscidae possuem espécies com dimorfismo enviesado para ambos os sexos, com a tendência geral do dimorfismo variando entre os clados (Figura 5). As espécies do clado 2 demonstram um tendência geral de dimorfismo enviesado para machos (SDI= -0,06 (-0,0675; 0,0350),  $W = 0$ ;  $P < 0,01$ ), não havendo espécies com dimorfismo enviesado para fêmeas. Por outro lado, o clado 4 demonstra uma tendência geral de dimorfismo enviesado para fêmeas (SDI= 0,065 (0,01; 0,011);  $W = 1251,5$ ;  $P < 0,001$ ). Já os clados 1 e 3 não apresentam tendência geral de dimorfismo (Clado 1: SDI= 0,01 (-0,04; 0,04);  $W = 116,15$ ;  $P = 0,68$ . Clado 3: SDI= 0,01 (-0,01; 0,035);  $W = 647,5$ ;  $P = 0,08$ ).



**Figura 5** – Distribuição do índice de dimorfismo sexual do tamanho (SDI) das espécies dos quatro clados subordinados à Muscidae analisados. Valores positivos indicam dimorfismo sexual do tamanho enviesado para fêmeas e valores negativos indicam um dimorfismo sexual do tamanho enviesado para os machos. F = fêmeas, M= machos. Linha tracejada indica SDI=0.

#### 4.2. Análise alométrica do SSD em Muscidae

A relação dos contrastes de fêmeas e machos suporta o modelo isométrico do SSD em Muscidae (terceiro cenário evolutivo) (Figura 6). Isso indica que tanto fêmeas quanto machos contribuem igualmente no SSD.

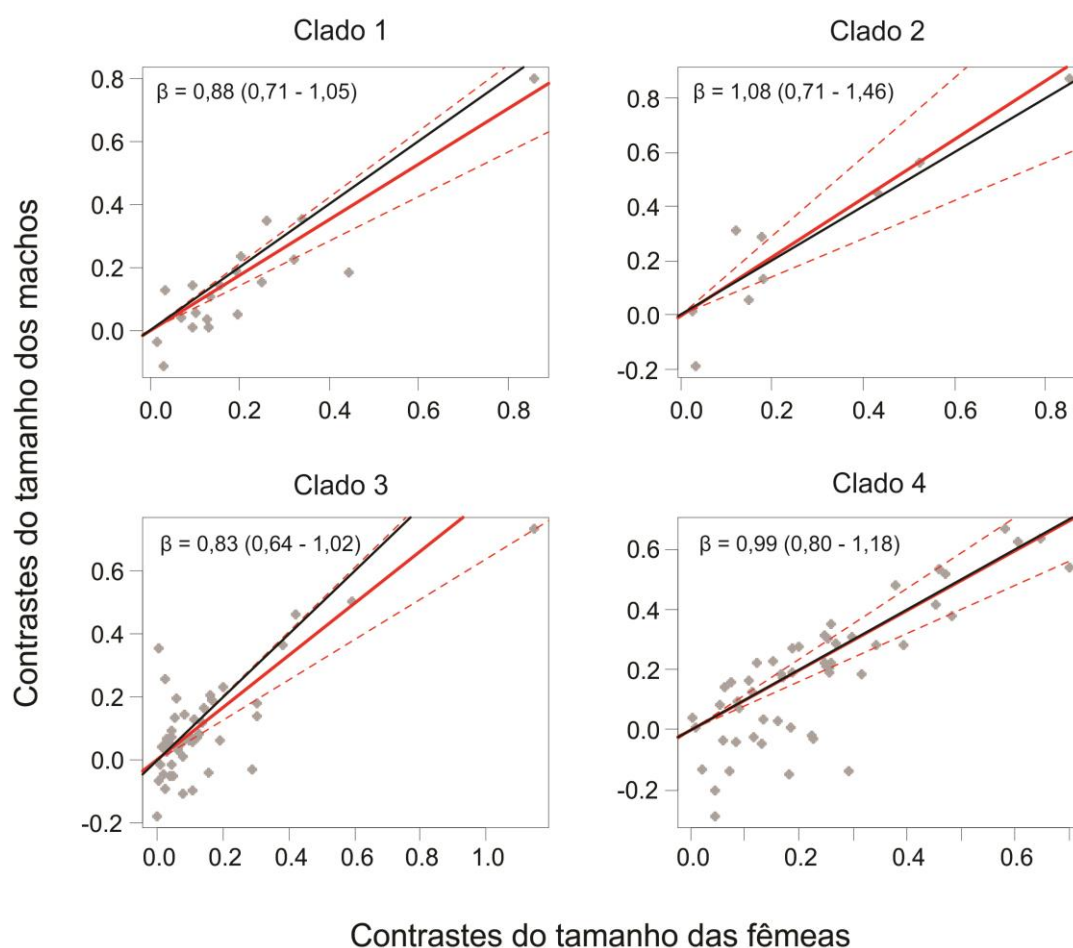


**Figura 6** – Regressão por Eixo Principal Reduzido (RMA) dos contrastes independentes dos machos (PICs) em relação aos contrastes independentes das fêmeas (PICs) do tamanho médio do tórax das espécies de Muscidae. A linha escura representa o modelo isométrico ( $\beta=1$ ) e a linha vermelha representa o ajuste do modelo RMA com intervalo de confiança de 95% (linhas tracejadas).

O modelo isométrico do SSD é mantido nos quatro clados subordinados à Muscidae (Figura 7). No entanto, a isometria do SSD no clado 3 deve ser vista com uma certa cautela, pois, o limite superior do intervalo de confiança está somente um pouco acima do valor de um (Figura 7). Isso indica que existe a tendência a uma hipoalometria do dimorfismo sexual do tamanho no clado 3, modelo alométrico contrário ao esperado pela regra de Rensch.

Foram identificadas espécies com valores extremos (outliers) em Muscidae e nos clados 1, 2 e 3. A retirada dessas espécies das análises não afeta o padrão isométrico descrito nos grupos analisados (resultados no Anexo V). No entanto, a tendência para a hipoalometria não foi mantida no clado 3, onde houve um aumento do coeficiente angular e uma ampliação do intervalo de confiança (Anexo V).

O padrão isométrico também foi mantido com os dados logaritmizados (Anexo VI) ou quando utilizadas as espécies sem corte mínimo no tamanho amostral (Anexo VII).



**Figura 7** – Regressão por eixo principal reduzido (RMA) dos contrastes independentes dos machos (PICs) em relação aos contrastes independentes das fêmeas (PICs) do tamanho médio do tórax das espécies dos quatro clados subordinados a Muscidae. A linha escura representa modelo isométrico ( $\beta=1$ ) e linha vermelha representa o ajuste do modelo RMA com intervalo de confiança de 95% (linhas tracejadas).

#### 4.3. Taxa de evolução de machos e fêmeas

A taxa de evolução do tamanho não difere entre fêmeas e machos de Muscidae (Tabela 1), indicando que ambos os sexos contribuem na manutenção do SSD conforme o terceiro cenário evolutivo de covariação do tamanho e SSD. Nos clados subordinados a Muscidae também não há diferença na taxa de evolução entre os sexos, exceto pelo clado 3 (Tabela 1). No clado 3 as fêmeas possuem uma taxa de evolução do tamanho maior que a dos machos, indicando que as fêmeas estão puxando o SSD nesse clado.

**Tabela 1** – Taxa de evolução ( $\sigma^2$ ) do tamanho de machos e fêmeas de Muscidae e dos clados analisados e resultado do teste da razão de verossimilhança – LRT (“*likelihood ratio test*”) com a probabilidade associada (P).

Grupos	Fêmeas	Machos	LRT	P
<b>Muscidae</b>	0,073	0,066	1,77	0,18
<b>Clado 1</b>	0,072	0,055	2,71	0,10
<b>Clado 2</b>	0,13	0,15	0,88	0,35
<b>Clado 3</b>	0,055	0,038	5,46	0,02
<b>Clado 4</b>	0,079	0,070	0,01	0,91

#### 4.4. Ajustes dos modelos de evolução do caráter

O modelo OU se ajusta significativamente melhor do que o modelo BM nos dados de tamanho de machos e fêmeas de Muscidae (Tabela 2). Isso indica que o tamanho evolui através de seleção estabilizadora em direção a um caráter ótimo em ambos os sexos. Em relação aos clados subordinados, com exceção do clado 2, o modelo O-U também se ajusta melhor aos dados que o modelo BM. Isso indica que a tendência de evolução do tamanho é mantida nos níveis taxonômicos menores. No caso

do clado 2, o modelo O-U teve um melhor ajuste para o tamanho das fêmeas, enquanto, em relação ao tamanho dos machos o modelo BM se ajustou melhor. Esses resultados contrastantes indicam que o tamanho segue modelos diferenciados de evolução entre os sexos nesse clado. No entanto, a probabilidade associada aos modelos de ambos os sexos está no limite do nível de significância estatística, e como esse clado possui um pequeno tamanho amostral, esses resultados devem ser vistos com cautela.

**Tabela 2** – Valor de log-likelihood para os modelos de evolução de caráter ajustados para o tamanho de machos e fêmeas e valor do teste de razão de verossimilhança (LRT - *likelihood ratio test*) com a probabilidade associada (P) nos diferentes níveis taxonomicos.

Grupos	Sexo	BM	O-U	LRT	P	Melhor ajuste
Muscidae	Fêmeas	-121,9	-10,3	223,2	< 0,001	O-U
	Machos	-112,2	-9,4	205,6	< 0,001	O-U
Clado 1	Fêmeas	-16,3	-10,3	9,3	0,001	O-U
	Machos	-13,6	-9,4	8,5	0,004	O-U
Clado 2	Fêmeas	-10,3	-8,3	3,9	0,048	O-U
	Machos	-10,8	-9,0	3,7	0,056	BM
Clado 3	Fêmeas	-42,3	-19,7	45,2	< 0,001	O-U
	Machos	-31,4	-13,3	36,1	< 0,001	O-U
Clado 4	Fêmeas	-44,8	-40,2	9,3	0,002	O-U
	Machos	-44,2	-40,1	8,2	0,004	O-U

\* P< 0,05. BM = Modelo de evolução Movimento Browniano. O-U = Modelo de evolução Ornstein–Uhlenbeck

Os resultados do PMC demonstram que a razão de verossimilhança observada é muito mais propensa ao modelo OU que ao modelo BM tanto para Muscidae quanto

para os clados subordinados (Anexo VIII). No entanto, há uma sobreposição maior da frequência da razão de verossimilhança dos dois modelos no clado 2 indicando que os dados são menos informativos para a comparação de modelos nesse clado.

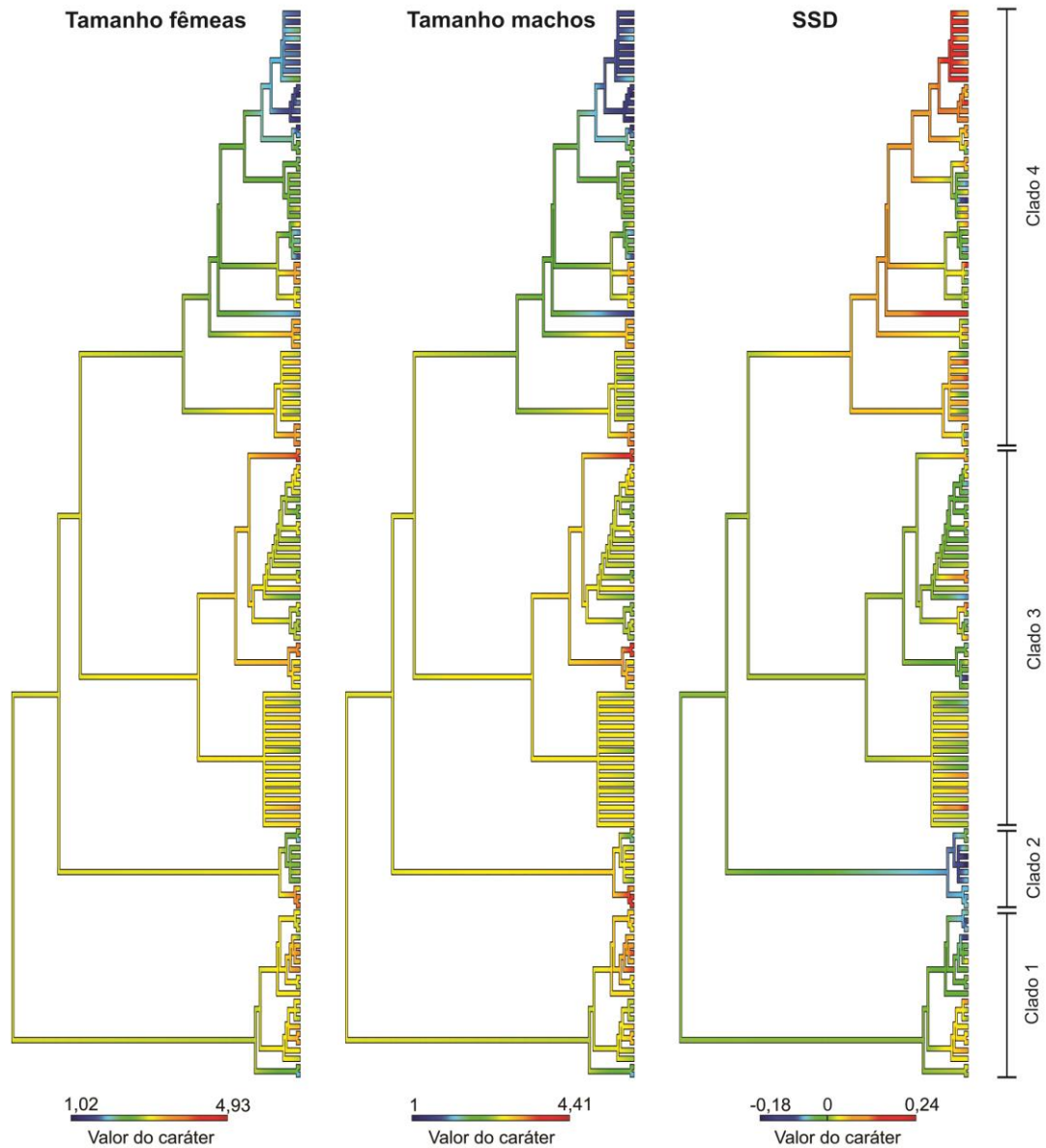
#### *4.5. Reconstrução do tamanho e dimorfismo sexual do tamanho em Muscidae*

O dimorfismo sexual enviesado tanto para fêmeas quanto para machos evoluiu várias vezes em Muscidae (Figura 8), indicando que, com algumas exceções, a tendência no SSD não é uma característica conservada ao longo dos clados. Além disso, a evolução do SSD está relacionada com mudanças evolutivas no tamanho tanto de machos quanto de fêmeas, indicando que ambos os sexos influenciam na evolução do SSD de Muscidae.

No clado 4 o ramo ancestral possui uma tendência de dimorfismo sexual enviesado para fêmeas, que é mantido em muitas espécies desse grupo. No entanto, é possível observar que houve reversão na direção do dimorfismo em algumas espécies desse clado, gerando um padrão misto de SSD com leve tendência de dimorfismo enviesado para fêmeas como visto no item 4.1 (Figura 8). O cenário evolutivo de mudança do tamanho e SSD no clado 4 mostrou-se bem complexo. Em algumas espécies o dimorfismo enviesado para fêmeas foi gerado principalmente pela redução do tamanho de machos e fêmeas. No entanto, em outras espécies o padrão de mudanças de tamanho de machos e fêmeas e o SSD não é claro. No clado 2, a tendência ancestral de dimorfismo sexual enviesado para os machos foi mantida ao longo da evolução do clado (Figura 8). Entretanto, em algumas espécies o dimorfismo enviesado para machos foi gerado por um aumento maior no tamanho dos machos em relação às fêmeas, enquanto em outras espécies houve uma redução do tamanho das fêmeas em relação ao



tamanho dos machos, indicando que o mesmo padrão de SSD foi gerado por caminhos diferentes. Já nos clados 1 e 3 o SSD assumiu direções diferentes ao longo da evolução dos grupos, sem tendência geral de dimorfismo (Figura 8).



**Figura 8** – Reconstrução dos caracteres ancestrais do tamanho de fêmeas e machos e do dimorfismo sexual do tamanho das espécies de Muscidae. Escala de tamanho de machos e fêmeas em milímetros. A escala do dimorfismo sexual do tamanho indica a proporção que um sexo é maior que o outro, onde valores positivos indicam dimorfismo enviesado para fêmeas e valores negativos indicam dimorfismo enviesado para machos.

## 5. DISCUSSÃO

A evolução e covariação do tamanho e SSD foi analisada em dípteros da Família Muscidae utilizando métodos filogenéticos comparados. Muscidae possui dimorfismo sexual do tamanho enviesado tanto para fêmeas quanto para machos, indicando que a tendência do SSD evoluiu em vários momentos ao longo da evolução do grupo. Também foi observado que Muscidae segue um padrão isométrico de dimorfismo sexual do tamanho, indicando que o nível de dimorfismo não está relacionado com o tamanho das espécies. Além disso, o tamanho é altamente correlacionado entre os sexos e evolui na mesma taxa em fêmeas e machos, o que aumenta o suporte ao modelo isométrico do SSD em Muscidae. O padrão isométrico também foi observado em níveis hierárquicos menores dentro de Muscidae.

### 5.1. *Dimorfismo sexual no tamanho em Muscidae*

Na maioria dos insetos, e invertebrados, o dimorfismo sexual no tamanho é enviesado para as fêmeas (Blanckenhorn *et al.*, 2007b; Fairbairn *et al.*, 2007). Apesar de Muscidae demonstrar uma tendência geral de dimorfismo enviesado para fêmeas, a família possui uma distribuição mista de SSD sendo formado por espécies com dimorfismo enviesado para fêmeas e espécies com dimorfismo enviesado para machos. A tendência geral do dimorfismo sexual em Muscidae varia em relação aos clados subordinados. O clado 2 possui uma tendência geral de dimorfismo enviesado para machos, não apresentando espécies com dimorfismo enviesado para fêmeas. Em contrapartida o clado 4 possui uma tendência geral de dimorfismo enviesado para fêmeas, apesar de possuir espécies com dimorfismo enviesado para machos. Já os clados 1 e 3 não apresentam tendência geral de dimorfismo e possuem uma distribuição

mista do SSD entre as espécies. A ocorrência da distribuição mista de dimorfismo em três dos quatro clados subordinados analisados indica que a direção do SSD evoluiu de forma independente entre os clados ao longo da evolução de Muscidae e que o padrão de dimorfismo encontrado no grupo não se enquadra no do que o padrão geral esperado em invertebrados.

Apesar do tamanho entre as espécies variar aproximadamente 4,5 vezes, o dimorfismo de Muscidae possui uma magnitude bem menor, sendo que a maioria das espécies possuem um SSD moderado. Em insetos a evolução do dimorfismo sexual esta restrita pelo limite fisiológico de desenvolvimento em cada instar larval (Esperk *et al.* 2007). Assim, em espécies cujas fêmeas possuem o mesmo número de instares larvais do que os machos é esperado um SSD moderado, enquanto em espécies onde um dos sexos possui um ou mais instares larvais é esperado um SSD elevado (Esperk *et al.* 2007). Como as espécies de Muscidae possuem o mesmo número de instares larvais é esperado que a maioria das espécies possuam um nível de SSD moderado.

## 5.2. Isometria em Muscidae

A regra de Rensch é baseada na ideia de que durante a evolução de um clado há uma divergência maior no tamanho dos machos em relação ao tamanho das fêmeas. Essa diferença geraria um modelo alométrico em que o nível de dimorfismo aumenta em espécies cujos machos são maiores e diminui em espécies cujas fêmeas são maiores em relação ao aumento do tamanho do corpo (Fairbairn *et al.*, 2007). Em Muscidae não foi detectado esse padrão alométrico. Muscidae demonstra um modelo isométrico do SSD, que se expressa por uma variação similar no tamanho de machos e fêmeas ao longo da evolução do grupo.

Quando o tamanho de machos e fêmeas muda na mesma taxa ao longo da evolução do grupo, ambos os sexos influenciam o SSD igualmente, gerando um modelo isométrico de SSD (Ceballos *et al.*, 2012). Nesse caso dois cenários são possíveis: no primeiro cenário fêmeas e machos podem evoluir para um tamanho ótimo em resposta a um modelo de seleção do tipo Ornstein–Uhlenbeck (O-U) e, no segundo cenário, o tamanho de fêmeas e machos podem seguir uma evolução neutra de tamanho do corpo de acordo com um modelo de Movimento Browniano (BM), não assumindo nenhuma direção. O modelo O-U se ajustou melhor aos dados de Muscidae e dos clados subordinados, com exceção dos machos do clado 2. Esses resultados sugerem que o tamanho do corpo está sendo direcionado para o tamanho ideal em cada sexo, nesse caso a força de seleção sexual que favorece machos maiores é contrabalanceada pela seleção de fecundidade que favorece fêmeas maiores, gerando a isometria (Ceballos *et al.*, 2012; Liao *et al.*, 2013). Dessa forma, em grupos com padrão isométrico do SSD é esperado que a evolução do SSD seja guiada pela variação do tamanho em ambos os sexos e não somente pela divergência maior do tamanho dos machos como descrito pela regra de Rensch. Esse cenário de evolução do SSD foi o observado em Muscidae. A análise dos caracteres ancestrais demonstra que a evolução do SSD em Muscidae é gerada pela variação tanto do tamanho de machos como do tamanho de fêmeas, sendo que em algumas espécies o dimorfismo é guiado principalmente pela variação maior do tamanho dos machos enquanto em outras espécies o dimorfismo é guiado pela variação maior do tamanho das fêmeas.

O padrão isométrico também ocorre nos quatro clados subordinados a Muscidae, indicando que esse padrão é mantido mesmo em níveis hierárquicos menores. No entanto, apesar do Clado 3 demonstrar um modelo isométrico do SSD, o intervalo de confiança superior do coeficiente angular do RMA está somente um pouco acima do

modelo isométrico, indicando uma tendência para um modelo alométrico contrário a regra de Rensch (“*converse Rensch’s rule*”). No modelo alométrico contrário a regra de Rensch é esperado que a alometria seja gerada por uma divergência maior do tamanho das fêmeas em relação ao tamanho dos machos ao longo da evolução do grupo (Herczeg *et al.*, 2010). Nesse caso, o nível de SSD aumenta em espécies cujas fêmeas são maiores e diminui em espécies cujos machos são maiores em relação ao aumento do tamanho do corpo. A tendência ao modelo contrário a regra de Rensch no Clado 3 é fortemente influenciada pelas espécies consideradas *outliers* (Anexo V). Nesse caso, a inclinação da reta alométrica possui um viés gerado pelas espécies com valores extremos de tamanho. No entanto, a taxa de evolução do tamanho difere entre os sexos nesse clado, sendo que as fêmeas possuem uma taxa de evolução maior que os machos conforme é esperado no modelo contrário a regra de Rensch. O modelo alométrico contrário a regra de Rensch ocorre, principalmente, em espécies cujas fêmeas são maiores e, possivelmente, está relacionado com a seleção da fecundidade das fêmeas (Abouheif & Fairbairn, 1997; Tubaro & Bertelli, 2003; Webb & Freckleton, 2007; Herczeg *et al.* 2010, Liao *et al.*, 2013). Dessa forma, é possível que o tamanho das fêmeas de Muscidae esteja sobre um processo de seleção forte o suficiente para gerar divergência nas taxas evolutivas entre os sexos, mas não para gerar um padrão alométrico.

Padrões isométricos do SSD já foram observados em anfíbios (Liao *et al.*, 2013), répteis (Ceballos *et al.*, 2012; Halámková *et al.*, 2012) e aves (Tubaro, & Bertelli 2003; Webb & Freckleton, 2007). A isometria também ocorre em insetos da ordem Odonata, subordem Anisoptera (Serrano-Meneses *et al.*, 2008), Em Orthoptera, na família Acrididae, subfamília Melanoplinae (Bidau *et al.*, 2013), e em Coleoptera e Lepidoptera (Blanckenhorn *et al.*, 2007b). Em Diptera a isometria ocorre, em nível

intraespecífico, em *Scathophaga stercoraria* (Linnaeus, 1758) (Scathophagidae) e *Sepsis cynipsea* (Linnaeus, 1758) (Sepsidae) (Kraushaar & Blanckenhorn, 2002). No entanto, em *S. stercoraria* a seleção do tamanho nos machos é mais intensa que nas fêmeas, indicando assim, um suporte parcial a regra de Rensch. Já em *Sepsis cynipsea* a seleção do tamanho ocorre na mesma intensidade em ambos os sexos, indicando que essa espécie não se enquadra nas premissas da regra de Rensch. Em *Drosophila*, no grupo *Drosophila obscura*, a regra de Rensch é assumida em relação ao tamanho da asa, mas não em relação ao tamanho do tórax que segue um modelo isométrico do SSD (Huey et al. 2006). No entanto, a análise dos dados de 42 espécies de *Drosophila* indicou um padrão alométrico segundo a regra de Rensch, sugerindo assim, que as análises no grupo *Drosophila obscura* tiveram fraco poder de teste para detectar o modelo alométrico devido ao baixo tamanho amostral (21 espécies). Tanto a alometria segundo a regra de Rensch em Scathophagidae e *Drosophila*, como a isometria em Sepsidae foram posteriormente confirmadas (Blanckenhorn et al., 2007b). Esses resultados sugerem que a isometria é um padrão muito mais comum do que se imaginava, indicando que nesses grupos o tamanho de machos e fêmeas covaria na mesma taxa ao longo da evolução.

O fato de padrões contrários à regra de Rensch ocorrerem comumente pode estar relacionada com o fato de que a evolução do SSD não é guiada somente pela seleção no tamanho do macho, mas também está relacionada com a seleção no tamanho das fêmeas. Assim em modelos isométricos é esperado que ambos os sexos influenciem o SSD enquanto em um modelo alométrico contrário a regra de Rensch é esperado, principalmente, que a seleção no tamanho das fêmeas guie a evolução do SSD. Por outro lado, existe a ideia de que a regra de Rensch esteja explícita no cenário isométrico gerado por processos seletivos (Ceballos et al., 2012). Dessa forma a alometria

conforme a regra de Rensch pode ser visualizada somente em grupos onde o processo de seleção sexual nos machos é mais pronunciado que o processo de fecundidade das fêmeas. Do contrário, modelo isométrico ou contrário a regra de Rensch é observado. O fato da regra de Rensch ser aplicada somente em clados em que há uma forte seleção sexual para os machos, em geral em grupos cujos machos são maiores, impossibilita a generalização dessa regra. Isso indica que os conceitos aplicados à regra de Rensch e o status de regra devem ser revistos.

### 5.3. *Quebra da regra de Rensch*

Apesar da regra de Rensch ser considerada uma regra geral para os animais, ela é inconsistente em grupos com dimorfismo misto ou com dimorfismo enviesado para fêmeas (Abouheif & Fairbairn, 1997; Tubaro & Bertelli, 2003; Webb & Freckleton, 2007; Liao *et al.*, 2013). Geralmente, em grupos cujos machos são maiores que as fêmeas ou em táxons mistos em que pelo menos 20% das espécies os machos sejam maiores, ocorre alometria do dimorfismo sexual compatível com a regra de Rensch (Abouheif & Fairbairn, 1997). Nossos resultados demonstram que Muscidae, apesar de ser um grupo misto de dimorfismo, não segue a regra de Rensch. Além disso, mesmo o clado 2, que predominantemente possui espécies com dimorfismo enviesado para machos, demonstra um padrão isométrico do SSD. A partir desses resultados, surge a seguinte questão: Muscidae deve ser considerado uma exceção à regra de Rensch? Na realidade não. A quebra da regra de Rensch ocorre em aves (Abouheif & Fairbairn, 1997; Tubaro & Bertelli, 2003; Webb & Freckleton, 2007), tartarugas (Stephens & Wiens, 2009; Ceballos *et al.*, 2012; Halámková *et al.*, 2012), peixes (Herczeg *et al.*, 2010), anuros (Liao *et al.*, 2013) e insetos (Kraushaar & Blanckenhorn, 2002; Blanckenhorn *et al.*, 2007b; Serrano-Meneses *et al.*, 2008; Bidau *et al.*, 2013).

Nesse contexto, Webb & Freckleton (2007), analisaram 1291 espécies de aves pertencentes a 30 famílias e encontraram suporte para a regra de Rensch em famílias onde o dimorfismo é enviesado para machos, mas observaram que essa regra não se aplica nas famílias onde o dimorfismo do tamanho é enviesado para as fêmeas. Além disso, esses autores revisaram trabalhos prévios com vários táxons (artrópodes, peixes, aves e répteis) com predomínio de dimorfismo enviesado para as fêmeas e constataram que a regra de Rensch é mais a exceção do que a regra nesses grupos. Nesse caso, o fato da regra de Rensch ocorrer apenas em táxons cujos machos são maiores que as fêmeas indicam que as hipóteses gerais que explicam a ocorrência desse fenômeno podem estar equivocadas. Assim, em táxons onde o dimorfismo sexual é enviesado para machos a hipótese em que a seleção sexual que favorece machos maiores guia o SSD tem sido bem aceita (Abouheif & Fairbairn, 1997), embora em grupos onde o dimorfismo é enviesado para fêmeas essa hipótese é menos aceita e a explicação para tais fenômenos pode exigir cenário evolutivos bem mais complexos (Tubaro & Bertelli, 2003; Webb & Freckleton, 2007; Liao *et al.*, 2013).

#### 5.4. Conclusões gerais

Apesar da maioria das espécies de Muscidae apresentarem dimorfismo sexual do tamanho enviesado para fêmeas, Muscidae possui uma tendência mista de dimorfismo sexual do tamanho, padrão diferente do esperado para insetos e artrópodos em geral. Além disso, Muscidae segue um padrão isométrico de dimorfismo sexual do tamanho, em que os tamanhos de machos e fêmeas variam na mesma taxa ao longo da evolução do grupo, influenciando igualmente o SDD. O modelo Ornstein–Uhlenbeck (O-U) demonstra o melhor ajuste para os dados de tamanho em Muscidae, indicando



que ambos os sexos estão sob o efeito de seleção estabilizadora. Dessa forma, é esperado que a seleção sexual que atua no tamanho dos machos seja contrabalanceada pela seleção da fecundidade que atua nas fêmeas, gerando assim o modelo isométrico de dimorfismo.

Os quatro clados subordinados a Muscidae também seguem um modelo isométrico do dimorfismo do tamanho. No entanto, no clado 3 as fêmeas possuem um taxa de evolução maior que os machos indicando uma tendência ao modelo contrário a regra de Rensch. A diferença na taxa evolutivo no clado 3 pode indicar que a seleção da fecundidade das fêmeas está guiando a evolução do SSD nesse clado.

A quebra do padrão alométrico conforme a regra de Rensch é mais comum do que parece, sendo que a validade da regra de Rensch como uma regra geral para os animais é controversa. Assim, Muscidae não pode ser considerado uma exceção a regra de Rensch, mas sim mais uma evidência de que os processos geradores dos padrões alométricos e isométricos de dimorfismo sexual do tamanho ainda não estão esclarecidos e mais estudos com enfoques evolutivos do grupo em vários níveis taxonômicos devem ser desenvolvidos para esclarecer os padrões de dimorfismo no tamanho encontrado nos animais e em especial nos insetos.

## 6. REFERÊNCIAS

- Abouheif E, Fairbairn DJ. 1997. A comparative analysis of allometry for sexual size dimorphism: assessing Rensch's rule. *American Naturalist* 540-562.
- Adams DC. 2013. Comparing evolutionary rates for different phenotypic traits on a phylogeny using likelihood. *Systematic biology* 62: 181-192.
- Astúa D. 2010. Cranial sexual dimorphism in New World marsupials and a test of Rensch's rule in Didelphidae. *Journal of Mammalogy* 91: 1011-1024.
- Bidau CJ, Marti DA, Castillo ER. 2013. Rensch's rule is not verified in melanopline grasshoppers (Acrididae). *Journal of Insect Biodiversity* 1: 1-14.
- Blanckenhorn WU, Dixon AFG, Fairbairn DJ, Foellmer MW, Gibert P, Van der Linde K, Meier R, Nylin S, Pitnick S, Schoff C, Signorelli M, Teder T, Wiklund C. 2007. Proximate Causes of Rensch's Rule: Does Sexual Size Dimorphism in Arthropods Result from Sex Differences in Development Time? *The American Naturalist* 169: 245-257.
- Blanckenhorn WU, Meier R, Teder T. 2007b. Rensch's rule in insects: patterns among and within species. In: Fairbairn DJ, Blanckenhorn WU, Székely T, eds. *Sex, Size and Gender Roles: Evolutionary Studies of Sexual Size Dimorphism*. Oxford: Oxford University Press.
- Blanckenhorn WU, Stillwell RC, Young KA, Fox CW, Ashton KG. 2006. When Rensch meets Bergmann: does sexual size dimorphism change systematically with latitude? *Evolution* 60: 2004-2011.

- Boettiger C, Coop G, Ralph P. 2012. Is your phylogeny informative? Measuring the power of comparative methods. *Evolution* 66: 2240-2251.
- Butler MA, King AA. 2004. Phylogenetic comparative analysis: a modeling approach for adaptive evolution. *The American Naturalist* 164: 683-695.
- Carvalho CJB. 2002. *Muscidae (Diptera) of the Neotropical Region: Taxonomy*. Curitiba: Editora UFPR.
- Ceballos CP, Adams DC, Iverson JB, Valenzuela N. 2012. Phylogenetic patterns of sexual size dimorphism in Turtles and their implications for Rensch's rule. *Evolutionary Biology* 1-15.
- Diniz-Filho JAF. 2000. *Métodos filogenéticos comparativos*. Ribeirão Preto: Editora Holos.
- Esperk T, Tammaru T, Nylin S, Teder T. 2007. Achieving high sexual size dimorphism in insects: females add instars. *Ecological entomology* 32: 243-256.
- Fairbairn DJ, Preziosi RF. 1994. Sexual selection and the evolution of allometry for sexual size dimorphism in the water strider, *Aquarius remigis*. *American Naturalist* 144: 101-118.
- Fairbairn DJ. 1997. Allometry for sexual size dimorphism: Pattern and process in the coevolution of body size in males and females. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28: 659-687.

- Fairbairn DJ, Blanckenhorn WU, Székely T. 2007. *Sex, Size and Gender Roles: Evolutionary Studies of Sexual Size Dimorphism*. Oxford: Oxford University Press.
- Felsenstein J. 1985. Phylogenies and the comparative method. *American Naturalist* 125: 1-15.
- Frýdlová P, Frynta D. 2010. A test of Rensch's rule in varanid lizards. *Biological journal of the Linnean Society* 100: 293-306.
- Garland T, Diaz-Uriarte R. 1999. Polytomies and phylogenetically independent contrasts: examination of the bounded degrees of freedom approach. *Systematic Biology* 48: 547-558.
- Garland T, Harvey PH, Ives AR. 1992. Procedures for the analysis of comparative data using phylogenetically independent contrasts. *Systematic Biology* 41: 18-32.
- Grafen A. 1989. The phylogenetic regression. *Philosophical Transactions of the Royal society of London, Series B. Biological Sciences* 326: 119–157.
- Halámková L, Schulte JA, Langen TA. 2013. Patterns of sexual size dimorphism in Chelonia. *Biological Journal of the Linnean Society* 108: 396-413.
- Harmon LJ, Weir JT, Brock CD, Glor RE, Challenger W. 2008. GEIGER: investigating evolutionary radiations. *Bioinformatics* 24: 129-131.
- Harvey PH, Pagel MD. 1991. *The Comparative Method in Evolutionary Biology*. Oxford: Oxford university press.

- Herczeg G, Gonda A, Merilä J. 2010. Rensch's rule inverted—female-driven gigantism in nine-spined stickleback *Pungitius pungitius*. *Journal of Animal Ecology* 79: 581-588.
- Huey RB, Moreteau B, Moreteau JC, Gibert P, Gilchrist GW, Ives AR, Garland T, David JR. 2006. Sexual size dimorphism in a *Drosophila* clade, the *D. obscura* group. *Zoology* 109: 318-330.
- Johnson JB, Omland KS. 2004. Model selection in ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution* 19: 101-108.
- Kraushaar URS, Blanckenhorn WU. 2002. Population variation in sexual selection and its effect on size allometry in two dung fly species with contrasting sexual size dimorphism. *Evolution* 56: 307-321.
- Liao WB, Zeng Y, Zhou CQ, Jehle R. 2013. Sexual size dimorphism in anurans fails to obey Rensch's rule. *Frontiers in Zoology* 10:10.
- Lovich JE, Gibbons JW. 1992. A review of techniques for quantifying sexual size dimorphism. *Growth, Development, and Aging: GDA* 56: 269 – 281.
- Löwenberg-Neto P, Carvalho CJB, Hawkins BA. 2011. Tropical niche conservatism as a historical narrative hypothesis for the Neotropics: a case study using the fly family Muscidae. *Journal of Biogeography* 38: 1936-1947.
- Paradis E, Claude J, Strimmer K. 2004. APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* 20: 289-290.

- Posada D, Crandall KA. 2001. Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. *Systematic Biology* 50: 580-601.
- Punzalan D, Hosken DJ. 2010. Sexual dimorphism: why the sexes are (and are not) different. *Current Biology* 20: 972-973.
- Purvis A, Garland T. 1993. Polytomies in comparative analyses of continuous characters. *Systematic Biology* 42: 569-575.
- R Development Core Team. 2012. *R: A Language and Environment for Statistical Computing, Version 2.15.1*. Disponível em: <http://www.r-project.org/>
- Revell LJ. 2012. phytools: an R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods in Ecology and Evolution* 3: 217-223.
- Revell LJ. 2013. Two new graphical methods for mapping trait evolution on phylogenies. *Methods in Ecology and Evolution* 4: 754-759.
- Rohlf FJ. 2010. *TPSDig, digitize landmarks and outlines, Version 2.16*. Disponível em: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>
- Schluter D, Price T, Mooers AØ, Ludwig D. 1997. Likelihood of ancestor states in adaptive radiation. *Evolution* 51: 1699-1711.
- Schuehl GS, Carvalho CJB, Wiegmann BM. 2007. Molecular phylogenetics of the Muscidae (Diptera: Calyptratae): new ideas in a congruence context. *Invertebrate Systematics* 21: 263-278.

- Serrano-Meneses MA, Córdoba-Aguilar A, Azpilicueta-Amorín M, González-Soriano E, Székely T. 2008. Sexual selection, sexual size dimorphism and Rensch's rule in Odonata. *Journal of Evolutionary Biology* 21: 1259-1273.
- Smith RJ, Cheverud JM. 2002. Scaling of sexual dimorphism in body mass: a phylogenetic analysis of Rensch's rule in primates. *International Journal of Primatology* 23: 1095-1135.
- Stephens PR, Wiens JJ. 2009. Evolution of sexual size dimorphisms in Emydid turtles: ecological dimorphism, Rensch's rule, and sympatric divergence. *Evolution* 63: 910-925.
- Stillwell RC, Blanckenhorn WU, Teder T, Davidowitz G, Fox CW. 2010. Sex differences in phenotypic plasticity affect variation in sexual size dimorphism in insects: from physiology to evolution. *Annual Review of Entomology* 55: 227-245.
- Tubaro PL, Bertelli S. 2003. Female-biased sexual size dimorphism in tinamous: a comparative test fails to support Rensch's rule. *Biological Journal of the Linnean Society* 80: 519-527.
- Webb TJ, Freckleton RP. 2007. Only half right: species with female-biased sexual size dimorphism consistently break Rensch's rule. *PLoS One* 2.

**ANEXO I**



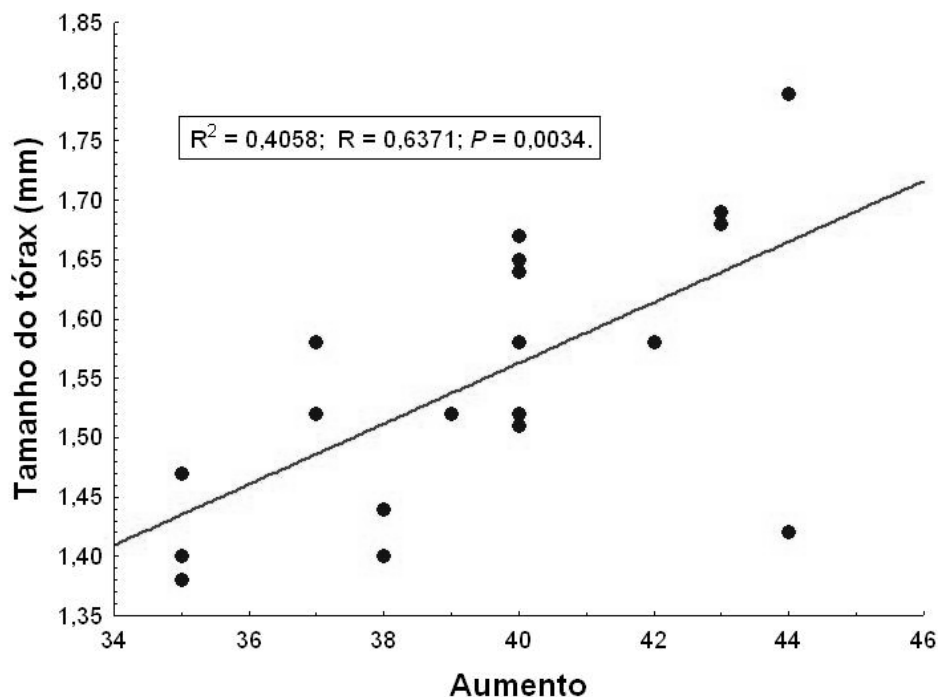
## **A1. Padronização das imagens e medidas**

Como os dados para realização do projeto baseia-se em medidas lineares obtidas a partir das imagens de exemplares de Muscidae, foi realizado o ajuste da metodologia com o objetivo de reduzir ao máximo o erro de obtenção das imagens e das medidas.

### *A1.1. Erro na obtenção das imagens*

Três erros podem afetar os valores das medidas dos exemplares de Muscidae: 1) erro de posição do exemplar durante a obtenção da imagem; 2) erro do aumento da ocular do sistema de captura de imagem (se o aumento durante a captura das imagens for alterado entre exemplares); e 3) erro na obtenção das medidas utilizando as imagens.

Para analisar o quanto o erro de posição e do aumento podem influenciar as medidas, foram capturadas 18 imagens de um mesmo exemplar em diferentes posições e aumentos de forma a obter o maior erro possível. Posteriormente foi realizada uma regressão entre o tamanho obtido em cada imagem e o aumento respectivo da mesma. Os resultados demonstram que o aumento afeta de forma significativa o tamanho obtido (Figura 1, média =  $1,55 \pm 0,12$  mm; coeficiente de variação = 7,5%;  $R^2 = 0,40$ ;  $P < 0,01$ ). A posição também influencia no erro (Figura 1, dispersão horizontal em cada aumento).



**Figura 1** - Regressão do tamanho do tórax (mm) em relação ao aumento da objetiva durante a captura da imagem.

Para reduzir o erro na obtenção das imagens duas providências principais foram tomadas: Primeira, o aumento foi padronizado para cada sessão de captura de imagens e/ou série de exemplares. Segunda, todos os exemplares foram fotografados na mesma posição. Assim, os exemplares foram posicionados sobre uma lâmina de microscopia com massa de modelar para fixação do alfinete. Ao lado esquerdo da lâmina foi fixado uma escala vertical de madeira de dois centímetros. Os exemplares foram posicionados com a linha anterior-posterior perpendicular à objetiva do sistema de imagem a uma altura de dois (2,0) cm da lâmina de microscopia. Isso permitiu a padronização da posição e distância do exemplar até o sistema de imagem.

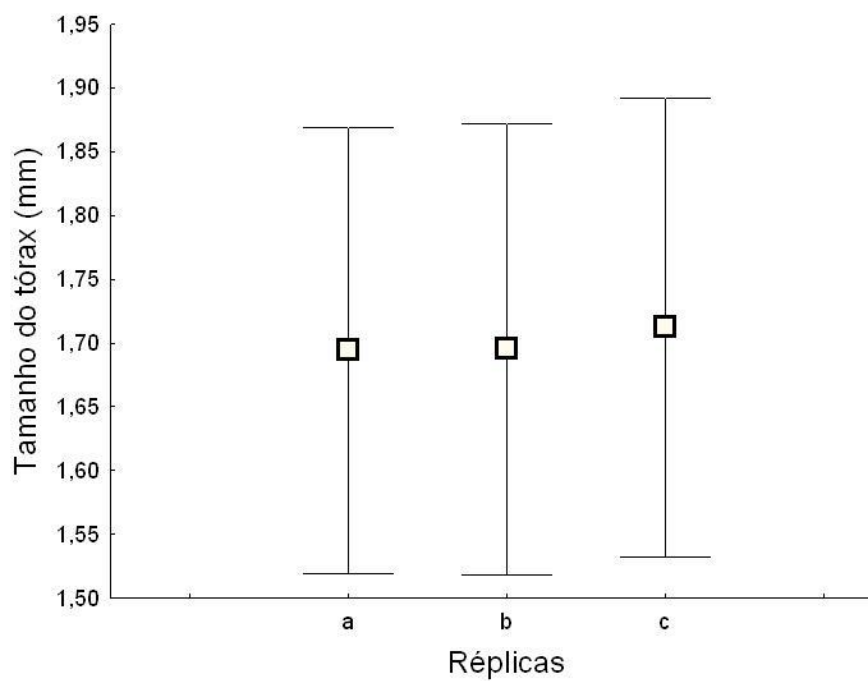
Para testar se a padronização da metodologia reduziu o erro, as imagens do mesmo exemplar foram novamente capturadas com o aumento e posição padronizados.

A padronização na captura das imagens reduziu substancialmente o erro de medida (média=1,57±0,03mm; CV=2,2%) comparada as medidas obtidas antes da padronização (média= 1,55±0,12 mm; CV=7,5%). É importante ressaltar que nesse erro está embutido o erro da medida das imagens.

#### *A1.2. Erro na obtenção das medidas*

Antes de cada sessão de captura de imagens foi obtida a imagem de uma escala milimetrada para conversão do tamanho de pixels em milímetros. A medida das imagens dos exemplares (tamanho do tórax) foram obtidas utilizando o programa TPS dig2 (Rohlf, 2005). Essa técnica permitiu a obtenção de medidas em uma escala de 0,01 mm, o que favoreceu uma comparação mais apurada entre macho e fêmeas, já que os menores exemplares medidos possuem em torno de um milímetro e assim foi possível detectar diferenças de até 1% de variação de tamanho entre esses exemplares.

Para analisar o erro na obtenção da medida das imagens 17 exemplares foram medidos três vezes. Para testar se as medidas diferem entre as réplicas foi realizado um teste ANOVA de um fator tendo as replicas como variável preditora e tamanho como variável resposta. Não houve diferença significativa na média entre as réplicas (média=1,70±0,01mm; CV=0,6%,  $F_{2,48}=0,051$ ;  $P=0,95$ ), indicando assim que o erro na medida das imagens não é significativo (Figura 2).



**Figura 2** – Média (quadrado) e desvio padrão (barras) das três réplicas de medidas realizadas em uma série de exemplares de Muscidae.

**ANEXO II**

## A2 – Tabela do tamanho das espécies de Muscidae

**Tabela 1** - Tamanho amostral (N), média e desvio padrão (DP) do tamanho do tórax (mm) de fêmeas e machos das espécies de Muscidae analisadas e índice de dimorfismo sexual do tamanho (SSD) das 132 espécies analisadas.

Subfamília	Espécie	Fêmea		Macho		SSD
		N	Média±DP	N	Média±DP	
Atherigoninae	<i>Atherigona orientalis</i>	11	1,82 ± 0,12	4	1,5 ± 0,13	0,21
Azeliinae	<i>Brachygasterina major</i>	6	4,04 ± 0,4	4	4,26 ± 0,23	-0,05
	<i>Brachygasterina violaceiventris</i>	6	3,8 ± 0,54	5	4,08 ± 0,24	-0,07
	<i>Hydrotaea acuta</i>	6	1,8 ± 0,16	8	1,85 ± 0,11	-0,03
	<i>Hydrotaea nicholsoni</i>	20	2,93 ± 0,24	20	3,01 ± 0,23	-0,03
	<i>Ophyra aenescens</i>	38	2,53 ± 0,19	37	2,68 ± 0,22	-0,06
	<i>Ophyra albuquerquei</i>	23	2,86 ± 0,17	20	3,03 ± 0,23	-0,06
	<i>Ophyra chalcogaster</i>	25	2,65 ± 0,19	20	3,12 ± 0,16	-0,18
	<i>Ophyra ignava</i>	11	2,74 ± 0,28	11	3,22 ± 0,19	-0,18
	<i>Ophyra solitaria</i>	26	2,71 ± 0,15	20	2,8 ± 0,19	-0,03
	<i>Palpibracus nigriventris</i>	16	3,09 ± 0,24	16	3,28 ± 0,24	-0,06
Coenosiinae	<i>Apsil atripes</i>	6	2,69 ± 0,24	6	2,48 ± 0,11	0,08
	<i>Bithoracochaeta annulata</i>	10	1,84 ± 0,14	8	1,54 ± 0,1	0,19
	<i>Bithoracochaeta atricornis</i>	27	1,75 ± 0,16	7	1,56 ± 0,32	0,12
	<i>Bithoracochaeta flavicoxa</i>	9	1,24 ± 0,2	21	1,11 ± 0,09	0,12
	<i>Bithoracochaeta maricaensis</i>	4	1,02 ± 0,05	8	1 ± 0,07	0,02

	<i>Bithoracochaeta plumata</i>	7	$1,66 \pm 0,23$	26	$1,5 \pm 0,09$	0,11
	<i>Cordiluroides listrada</i>	16	$2,43 \pm 0,18$	9	$2 \pm 0,12$	0,22
	<i>Limnophora altaneira</i>	6	$2,68 \pm 0,28$	7	$2,54 \pm 0,39$	0,06
	<i>Limnophora aurifacies</i>	27	$2,93 \pm 0,16$	19	$2,79 \pm 0,2$	0,05
	<i>Limnophora longiseta</i>	4	$2,36 \pm 0,27$	6	$2,77 \pm 0,35$	-0,17
	<i>Limnophora paranaensis</i>	23	$2,6 \pm 0,2$	26	$2,53 \pm 0,21$	0,03
	<i>Limnophora piliseta</i>	16	$2,6 \pm 0,41$	19	$2,78 \pm 0,18$	-0,07
	<i>Limnophora saeva</i>	16	$2,76 \pm 0,3$	15	$2,74 \pm 0,25$	0,01
	<i>Lispe latana</i>	9	$2,73 \pm 0,13$	9	$2,63 \pm 0,09$	0,04
	<i>Lispe serotina</i>	18	$2,12 \pm 0,2$	7	$1,92 \pm 0,12$	0,1
	<i>Neodexiopsis erecta</i>	30	$1,78 \pm 0,16$	7	$1,56 \pm 0,11$	0,14
	<i>Neodexiopsis facilis</i>	29	$1,69 \pm 0,13$	21	$1,52 \pm 0,09$	0,11
	<i>Neodexiopsis neoaustralis</i>	11	$1,75 \pm 0,29$	11	$1,41 \pm 0,12$	0,24
	<i>Neodexiopsis nigerrima</i>	30	$1,43 \pm 0,15$	18	$1,21 \pm 0,19$	0,18
	<i>Neodexiopsis paranaensis</i>	38	$2,09 \pm 0,23$	30	$1,95 \pm 0,09$	0,07
	<i>Neodexiopsis paulistensis</i>	15	$2,23 \pm 0,28$	4	$1,82 \pm 0,13$	0,23
	<i>Neodexiopsis setipuncta</i>	37	$1,44 \pm 0,14$	35	$1,16 \pm 0,06$	0,24
	<i>Neodexiopsis similis</i>	24	$1,69 \pm 0,12$	19	$1,57 \pm 0,13$	0,08
	<i>Reynoldsia coxata</i>	8	$2,63 \pm 0,22$	4	$2,75 \pm 0,24$	-0,05
	<i>Schoenomyza napensis</i>	11	$1,14 \pm 0,11$	14	$1,06 \pm 0,08$	0,08
	<i>Spathipheromyia atra</i>	11	$2 \pm 0,13$	10	$1,91 \pm 0,16$	0,05
Dichaetomyiinae	<i>Cariocamyia maculosa</i>	24	$3,41 \pm 0,47$	22	$3,44 \pm 0,46$	-0,01
	<i>Charadrella</i>	30	$4,93 \pm 0,19$	30	$4,41 \pm 0,27$	0,12

*malacophaga*

<i>Cyrtoneurina uber</i>	6	$2,45 \pm 0,34$	9	$2,61 \pm 0,18$	-0,07
<i>Cyrtoneuropsis conspersa</i>	21	$3,22 \pm 0,07$	20	$3,17 \pm 0,19$	0,02
<i>Cyrtoneuropsis dubia</i>	20	$2,86 \pm 0,14$	15	$2,81 \pm 0,18$	0,02
<i>Cyrtoneuropsis fuscicosta</i>	14	$3,2 \pm 0,14$	5	$2,96 \pm 0,26$	0,08
<i>Cyrtoneuropsis incognita</i>	24	$2,91 \pm 0,14$	24	$2,91 \pm 0,18$	0
<i>Cyrtoneuropsis maculipennis</i>	19	$2,74 \pm 0,32$	25	$2,79 \pm 0,21$	-0,02
<i>Cyrtoneuropsis mellina</i>	4	$2,99 \pm 0,32$	13	$3,13 \pm 0,18$	-0,05
<i>Cyrtoneuropsis mimica</i>	21	$3,07 \pm 0,28$	13	$2,93 \pm 0,19$	0,05
<i>Cyrtoneuropsis multomaculata</i>	11	$3,29 \pm 0,38$	6	$3,18 \pm 0,31$	0,03
<i>Cyrtoneuropsis neotrita</i>	12	$3,01 \pm 0,4$	6	$3,21 \pm 0,49$	-0,07
<i>Cyrtoneuropsis pararescita</i>	19	$2,64 \pm 0,15$	21	$2,63 \pm 0,2$	0
<i>Cyrtoneuropsis polystigma</i>	19	$2,92 \pm 0,28$	21	$2,89 \pm 0,22$	0,01
<i>Cyrtoneuropsis protosetosa</i>	21	$2,91 \pm 0,34$	20	$3,04 \pm 0,3$	-0,04
<i>Cyrtoneuropsis rescita</i>	24	$2,54 \pm 0,23$	18	$2,62 \pm 0,19$	-0,03
<i>Cyrtoneuropsis spiloptera</i>	7	$2,74 \pm 0,32$	9	$2,76 \pm 0,19$	-0,01
<i>Cyrtoneuropsis veniseta</i>	20	$2,96 \pm 0,24$	20	$2,79 \pm 0,31$	0,06
<i>Cyrtoneuropsis walkeri</i>	7	$2,64 \pm 0,31$	7	$2,35 \pm 0,09$	0,12
<i>Neomuscina atincticosta</i>	20	$3,19 \pm 0,18$	18	$3,12 \pm 0,29$	0,02



<i>Neomuscina capalta</i>	9	$3,18 \pm 0,26$	10	$3,11 \pm 0,25$	0,02
<i>Neomuscina currani</i>	4	$3,44 \pm 0,39$	13	$3,03 \pm 0,33$	0,14
<i>Neomuscina goianensis</i>	37	$3,16 \pm 0,22$	37	$3,11 \pm 0,23$	0,02
<i>Neomuscina inflexa</i>	25	$3,04 \pm 0,27$	24	$2,87 \pm 0,22$	0,06
<i>Neomuscina instabilis</i>	29	$2,99 \pm 0,24$	28	$2,87 \pm 0,2$	0,04
<i>Neomuscina mediana</i>	20	$3,08 \pm 0,2$	20	$2,86 \pm 0,25$	0,08
<i>Neomuscina neosimilis</i>	28	$3,01 \pm 0,25$	20	$3,04 \pm 0,32$	-0,01
<i>Neomuscina nigricosta</i>	20	$3,12 \pm 0,21$	15	$3,12 \pm 0,2$	0
<i>Neomuscina paramediana</i>	20	$2,73 \pm 0,21$	17	$2,7 \pm 0,2$	0,01
<i>Neomuscina pictipennis</i>	31	$3,01 \pm 0,23$	36	$2,97 \pm 0,22$	0,01
<i>Neomuscina schadei</i>	27	$3,14 \pm 0,25$	27	$2,97 \pm 0,16$	0,06
<i>Neomuscina similata</i>	7	$3,18 \pm 0,2$	5	$3,08 \pm 0,07$	0,03
<i>Neomuscina stabilis</i>	15	$3,16 \pm 0,25$	20	$3,07 \pm 0,25$	0,03
<i>Neomuscina tinctinervis</i>	19	$3,21 \pm 0,23$	11	$3,17 \pm 0,29$	0,01
<i>Neomuscina vitoriae</i>	15	$2,83 \pm 0,17$	12	$2,96 \pm 0,13$	-0,05
<i>Neomuscina zosteris</i>	47	$2,89 \pm 0,25$	46	$2,82 \pm 0,22$	0,02
<i>Pseudoptilolepis chrysella</i>	19	$2,91 \pm 0,41$	4	$2,72 \pm 0,27$	0,07
<i>Pseudoptilolepis fluminensis</i>	14	$2,77 \pm 0,3$	15	$2,85 \pm 0,28$	-0,03
<i>Pseudoptilolepis fulvapoda</i>	27	$2,81 \pm 0,28$	30	$2,94 \pm 0,26$	-0,05
<i>Pseudoptilolepis nigripoda</i>	7	$3,08 \pm 0,24$	8	$2,69 \pm 0,31$	0,14
<i>Pseudoptilolepis nudapleura</i>	31	$2,7 \pm 0,24$	16	$2,73 \pm 0,28$	-0,01

Muscinae	<i>Biopyrellia bipuncta</i>	87	$3,11 \pm 0,24$	71	$3,14 \pm 0,28$	-0,01
	<i>Haematobia irritans</i>	19	$1,71 \pm 0,12$	21	$1,7 \pm 0,12$	0,01
	<i>Morellia humeralis</i>	30	$2,82 \pm 0,24$	28	$2,93 \pm 0,22$	-0,04
	<i>Morellia nigricosta</i>	23	$2,91 \pm 0,31$	22	$3,07 \pm 0,3$	-0,05
	<i>Morellia paulistensis</i>	27	$3,66 \pm 0,23$	22	$3,69 \pm 0,2$	-0,01
	<i>Morellia xanthoptera</i>	25	$2,87 \pm 0,3$	20	$3,22 \pm 0,28$	-0,12
	<i>Parapyrellia maculipennis</i>	16	$3,15 \pm 0,25$	19	$3,13 \pm 0,28$	0,01
	<i>Polietina bicolor</i>	14	$2,84 \pm 0,38$	31	$2,81 \pm 0,24$	0,01
	<i>Polietina flavithorax</i>	15	$3,44 \pm 0,23$	12	$3,28 \pm 0,24$	0,05
	<i>Polietina major</i>	25	$3,35 \pm 0,17$	30	$3,23 \pm 0,27$	0,04
	<i>Polietina minor</i>	32	$2,91 \pm 0,23$	14	$2,85 \pm 0,25$	0,02
	<i>Polietina nigra</i>	20	$3,3 \pm 0,23$	10	$3,18 \pm 0,13$	0,04
	<i>Polietina orbitalis</i>	30	$2,89 \pm 0,26$	30	$2,78 \pm 0,22$	0,04
	<i>Polietina steini</i>	30	$3,05 \pm 0,28$	8	$2,84 \pm 0,22$	0,07
	<i>Polietina univittata</i>	30	$3,11 \pm 0,27$	26	$2,86 \pm 0,22$	0,09
	<i>Sarcopromusca pruna</i>	30	$3,04 \pm 0,28$	30	$3,16 \pm 0,32$	-0,04
	<i>Stomoxys calcitrans</i>	31	$2,85 \pm 0,23$	30	$2,76 \pm 0,25$	0,03
	<i>Trichomorellia trichops</i>	4	$2,73 \pm 0,23$	11	$3,15 \pm 0,28$	-0,15
	<i>Xenomorellia holti</i>	24	$3,34 \pm 0,34$	17	$3,2 \pm 0,27$	0,04
	<i>Xenomorellia inca</i>	25	$3,74 \pm 0,3$	11	$3,73 \pm 0,2$	0
Mydaeinae	<i>Xenomorellia montanhesa</i>	16	$3,28 \pm 0,28$	10	$3,4 \pm 0,27$	-0,04
	<i>Brontaea cilifera</i>	5	$1,54 \pm 0,14$	18	$1,57 \pm 0,15$	-0,02
	<i>Brontaea debilis</i>	30	$2,5 \pm 0,24$	28	$2,67 \pm 0,3$	-0,07
	<i>Brontaea normata</i>	27	$2,15 \pm 0,21$	8	$2,22 \pm 0,23$	-0,03

Phaoniinae	<i>Brontaea quadristigma</i>	25	1,81 ± 0,24	15	1,79 ± 0,27	0,01
	<i>Graphomya maculata</i>	18	3,44 ± 0,41	9	3,6 ± 0,37	-0,05
	<i>Graphomya mexicana</i>	17	3,36 ± 0,17	20	3,33 ± 0,28	0,01
	<i>Graphomya tropicalis</i>	15	3,64 ± 0,24	4	3,1 ± 0,3	0,17
	<i>Mydaea plaumanni</i>	31	3,15 ± 0,17	20	2,95 ± 0,25	0,07
	<i>Myospila cyanea</i>	13	3,09 ± 0,29	19	3,13 ± 0,23	-0,01
	<i>Myospila obscura</i>	23	3,18 ± 0,22	20	3,09 ± 0,17	0,03
	<i>Myospila pallidicornis</i>	11	2,8 ± 0,19	11	2,75 ± 0,18	0,02
	<i>Dolichophaonia catarinensis</i>	8	3,38 ± 0,33	16	3,48 ± 0,5	-0,03
	<i>Dolichophaonia gallicola</i>	6	3,08 ± 0,2	4	2,92 ± 0,13	0,05
	<i>Dolichophaonia santoamarensis</i>	5	3,5 ± 0,24	5	3,25 ± 0,39	0,08
	<i>Dolichophaonia trigona</i>	6	3,41 ± 0,24	10	3,38 ± 0,39	0,01
	<i>Helina angustipennis</i>	21	3,85 ± 0,23	17	3,6 ± 0,27	0,07
	<i>Helina evecta</i>	5	3,27 ± 0,3	15	3,54 ± 0,27	-0,08
	<i>Helina praecipua</i>	39	3,47 ± 0,25	39	3,12 ± 0,2	0,11
	<i>Phaonia annulata</i>	27	3,06 ± 0,35	27	2,86 ± 0,28	0,07
	<i>Phaonia bigoti</i>	30	2,78 ± 0,29	31	2,82 ± 0,21	-0,01
	<i>Phaonia grajauensis</i>	32	3,03 ± 0,37	30	2,82 ± 0,24	0,07
	<i>Phaonia lentinosa</i>	18	2,76 ± 0,26	8	2,81 ± 0,17	-0,02
	<i>Phaonia nigriventris</i>	30	3,33 ± 0,31	29	3,12 ± 0,29	0,07
	<i>Phaonia praesuturalis</i>	30	2,94 ± 0,32	27	2,59 ± 0,25	0,14
	<i>Phaonia shannoni</i>	30	3,04 ± 0,41	24	2,92 ± 0,36	0,04
	<i>Phaonia similata</i>	31	3,26 ± 0,41	33	2,87 ± 0,28	0,14

Reinwardtiinae	<i>Phaonia trispila</i>	30	$2,87 \pm 0,36$	30	$2,9 \pm 0,34$	-0,01
	<i>Muscina stabulans</i>	20	$3,78 \pm 0,33$	20	$3,72 \pm 0,37$	0,02
	<i>Psilochaeta chalybea</i>	20	$3,01 \pm 0,3$	18	$2,97 \pm 0,32$	0,01
	<i>Psilochaeta chlorogaster</i>	22	$3 \pm 0,22$	32	$3,49 \pm 0,15$	-0,16
	<i>Psilochaeta pampiana</i>	31	$3,27 \pm 0,22$	25	$3,29 \pm 0,29$	-0,01
	<i>Psilochaeta violescens</i>	34	$2,99 \pm 0,21$	30	$2,91 \pm 0,2$	0,03
	<i>Synthesiomyia nudiseta</i>	24	$3,78 \pm 0,31$	30	$3,96 \pm 0,4$	-0,05

---

**ANEXO III**

### A3. Filogenia composta de Muscidae

#### A3.1. Referências utilizadas na montagem da filogenia composta de Muscidae

A filogenia composta de Muscidae foi construída utilizando como base a supertree de Muscidae com 128 táxons terminais em nível de gênero construída por Löwenberg-Neto *et al.*, (2011). A partir deste cenário base em cada terminal de gênero da supertree foram adicionados manualmente as filogenias publicadas com espécies como táxons terminais (Tabela 1). As espécies pertencentes aos gêneros sem hipóteses filogenéticas foram inseridas na filogenia como uma politomia.

A notação parentética da filogenia composta de Muscidae contendo as 132 espécies analisadas é a seguinte:

“(((Haematobia\_irritans,Stomoxys\_calcitrans),((Polietina\_orbitalis,(Polietina\_steini,((Polietina\_flavithorax,Polietina\_major),Polietina\_nigra,(Polietina\_bicolor,Polietina\_minor,Polietina\_univittata))))),(Biopyrellia\_bipuncta,(((Morellia\_humeralis,Parapyrellia\_maculipennis),(Morellia\_paulistensis,((Xenomorellia\_holti,Xenomorellia\_inca,Xenomorellia\_montanhesa),Trichomorellia\_trichops))),((Morellia\_nigricosta,Morellia\_xanthoptera),Sarcopromusca\_pruna))))),(((Brachygasterina\_major,Brachygasterina\_violaceiventris),Palpibracus\_nigriventris),((Ophyra\_aenescens,Ophyra\_albuquerquei,Ophyra\_chalcogaster,Ophyra\_ignava,Ophyra\_solitaria),(Hydrotaea\_acuta,Hydrotaea\_nicholsoni))),(((Neomuscina\_atincticosta,Neomuscina\_capalta,Neomuscina\_currani,Neomuscina\_goianensis,Neomuscina\_inflexa,Neomuscina\_instabilis,Neomuscina\_mediana,Neomuscina\_neosimilis,Neomuscina\_nigricosta,Neomuscina\_paramediana,Neomuscina\_pictipennis,Neomuscina\_schadei,Neomuscina\_similata,Neomuscina\_stabilis,Neomuscina\_tinctinervis,Neomuscina\_vitoriae,Neomuscina\_zosteris),(((Psilochaeta\_chalybea,Psilochaeta\_chlorogast

er, *Psilochaeta\_pampiana*, *Psilochaeta\_violescens*), (*Muscina\_stabulans*, *Synthesiomia\_nudiseta*)), (((((Pseudoptilolepis\_chrysella, (Pseudoptilolepis\_fluminensis, Pseudoptilolepis\_fulvapoda)), (Pseudoptilolepis\_nudapleura, Pseudoptilolepis\_nigripoda)), (Cyrtoneurina\_uber, (Cyrtoneuropsis\_conspersa, ((Cyrtoneuropsis\_fuscicosta, Cyrtoneuropsis\_walker), (Cyrtoneuropsis\_dubia, (Cyrtoneuropsis\_incognita, (Cyrtoneuropsis\_polystigma, (Cyrtoneuropsis\_maculipennis, ((Cyrtoneuropsis\_mellina, Cyrtoneuropsis\_veniseta), ((Cyrtoneuropsis\_rescita, Cyrtoneuropsis\_pararescita), Cyrtoneuropsis\_spiloptera, (Cyrtoneuropsis\_protosetosa, (Cyrtoneuropsis\_neotrita, (Cyrtoneuropsis\_mimica, Cyrtoneuropsis\_multomaculata)))))))))), (Charadrella\_malacophaga, Cariocamyia\_maculosa))), (((Helina\_angustipennis, Helina\_evecta, Helina\_praecipua), (Phaonia\_annulata, Phaonia\_bigoti, Phaonia\_grajauensis, Phaonia\_lentinosa, Phaonia\_nigriventris, Phaonia\_praesuturalis, Phaonia\_shannoni, Phaonia\_similata, Phaonia\_trispila)), ((Dolichophaonia\_catarinensis, Dolichophaonia\_gallicola, Dolichophaonia\_santoamarensis, Dolichophaonia\_trigona), (Atherigona\_orientalis, (((Myospila\_cyanea, Myospila\_obscura, Myospila\_pallidicornis), (Graphomya\_maculata, Graphomya\_mexicana, Graphomya\_tropicalis), (Brontaea\_cilifera, Brontaea\_debilis, Brontaea\_normata, Brontaea\_quadristigma), Mydaea\_plaumanni))), ((Limnophora\_altanira, Limnophora\_aurifacies, Limnophora\_longiseta, Limnophora\_paranaensis, Limnophora\_piliseta, Limnophora\_saeva), (Lispe\_latana, Lispe\_serotina))), ((Reynoldsia\_coxata, Apsilatripes), (Spathipheromyia\_atra, Schoenomyza\_napensis)), ((Bithoracochaeta\_flavicoxa, (Bithoracochaeta\_atricornis, (Bithoracochaeta\_annulata, (Bithoracochaeta\_maricaensis, Bithoracochaeta\_plumata)))), (Cordiluroides\_listrada, (Neodexiopsis\_erecta, Neodexiopsis\_facilis, Neodexiopsis\_neoaustralis, Neodexiopsis\_nigerrima, Neodexiopsis\_paranaensis, Neodexiopsis\_paulistensis, Neodexiopsis\_setipuncta, Neodexiopsis\_similis))))))));”

**Tabela 1** – Filogenias publicadas com terminais em nível específico utilizadas na montagem da filogenia composta de Muscidae.

Grupo	Referência
Subfamília Muscini	Nihei & Carvalho (2007)
<i>Apsil</i> e <i>Reynoldsia</i>	Carvalho & Couri (2002)
<i>Bithoracochaeta</i>	Couri & Motta (2000)
<i>Brachygasterina</i>	Carvalho & Pont (2006)
<i>Cyrtoneuropsis</i> e <i>Cyrtoneurina</i>	Haseyama & Carvalho (2012)
<i>Depanocnemis</i>	Couri & Carvalho (2008)
<i>Palpibracus</i>	Soares & Carvalho (2005)
<i>Polietina</i>	Nihei & Carvalho (2007b)
<i>Pseudoptilolepis</i>	Schnell & Carvalho (2005)
<i>Souzalopesmyia</i>	Carvalho (1999)
<i>Stomoxys</i> , <i>Prostomoxys</i> , <i>Haematobosca</i> e <i>Haematobia</i>	Dsouli <i>et al.</i> (2011)
<i>Thricops</i>	Savage <i>et al.</i> (2004)



### A3.1. Referências

- Carvalho CJB. 1999. Revision, cladistics and biogeography of the Neotropical genus *Souzalopesmyia* Albuquerque (Diptera: Muscidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 101: 123-137.
- Carvalho CJB, Couri MS. 2002. Cladistic and biogeographic analyses of *Apsil Malloch* and *Reynoldsia Malloch* (Diptera: Muscidae) of southern South America. *Proceedings-Entomological Society Of Washington* 104: 309-309.
- Carvalho CJB, Pont AC. 2006. Taxonomy, cladistics and biogeography of the South American genus *Brachygasterina* Macquart (Diptera: Muscidae). *Zootaxa* 1151: 1-26.
- Couri MS, Carvalho CJB. 2008. A review of the Neotropical genus *Drepanocnemis* Stein (Diptera, Muscidae), with phylogenetic analysis and biogeographic considerations of its species. *Journal of Natural History* 42: 2659-2678.
- Couri MS, Motta HD. 2000. A cladistic analysis of *Bithoracochaeta* Stein (Diptera, Muscidae). *Revista Brasileira de Entomologia* 44: 105-108.
- Dsouli N, Delsuc F, Michaux J, De Stordeur E, Couloux A, Veuille M, Duvallet G. 2011. Phylogenetic analyses of mitochondrial and nuclear data in haematophagous flies support the paraphyly of the genus *Stomoxys* (Diptera: Muscidae). *Infection, Genetics and Evolution* 11: 663-670.
- Haseyama KL, Carvalho CJB. 2012. A new species of *Cyrtoneuropsis* (Diptera: Muscidae) with considerations on the phylogeny of the genus. *Zoologia* 29: 549-556.

- Löwenberg-Neto P, Carvalho CJB, Hawkins BA. 2011. Tropical niche conservatism as a historical narrative hypothesis for the Neotropics: a case study using the fly family Muscidae. *Journal of Biogeography* 38: 1936-1947.
- Nihei SS, Carvalho CJB. 2007. Phylogeny and classification of Muscini (Diptera, Muscidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 149: 493-532.
- Nihei SS, Carvalho CJB. 2007b. Systematics and biogeography of *Polietina* Schnabl & Dziedzicki (Diptera, Muscidae): Neotropical area relationships and Amazonia as a composite area. *Systematic Entomology* 32: 477-501.
- Savage J, Wheeler TA, Wiegmann BM. 2004. Phylogenetic analysis of the genus *Thricops* Rondani (Diptera: Muscidae) based on molecular and morphological characters. *Systematic Entomology* 29: 395-414.
- Soares EDG, Carvalho CJB. 2005. Taxonomia, análise cladística e descrição de uma espécie nova de *Palpibracus* Rondani (Diptera, Muscidae). *Revista Brasileira de Entomologia* 49: 171-180.
- Schuehli GS, Carvalho CJB. 2005. Revision and cladistics of the Neotropical genus *Pseudoptilolepis* Snyder (Diptera, Muscidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 22: 23-34.

**ANEXO IV**

## A4 – Função da análise de Regressão do Eixo Principal Reduzido (RMA)

### A4.1. Função RMA passando pela origem

A função que calcula o coeficiente angular e intervalo de confiança da Regressão do Eixo Principal Reduzido (RMA) passando pela origem foi realizada no ambiente R 2.15.1 (R Development Core Team, 2012) utilizando as equações apresentadas no trabalho de Garland *et al.* (1992). A função necessita do pacote “ape” (Paradis *et al.*, 2004) para o cálculo dos Contrastes Filogenéticos Independentes (PICs).

### Função RMA

*Descrição:* Calcula o coeficiente angular e intervalo de confiança da Regressão do Eixo Principal Reduzido (RMA) utilizando as equações apresentadas no trabalho de Garland *et al.* (1992).

*Uso:* rma(x,y,tree)

*Argumentos:*

x, y = Vetores numéricos nominados conforme os terminais da filogenia (tree)

tree = Um objeto da classe "phylo"

*Valor:* retorna uma lista com o valor do coeficiente angular (“beta.rma”) e o intervalo de confiança (“ci.inf”, “ci.sup”) do RMA e os valores de PICs positivados para fêmeas (“x”) e machos (“y”) conforme o trabalho de Garland *et al.* (1992)

```
rma<-function(x,y,tree){
  co.x <- pic(x, tree) #calcula dos contrastes independentes
  co.y <- pic(y, tree) #calcula dos contrastes independentes
```

```
positive.x <- function(x, y) #função que converte os valores negativos dos contrastes horizontais em
#valores positivos
```

```
{
  for(i in 1:length(x))
  {
    if(x[i] < 0 & y[i] < 0)
    {
      x[i] = abs(x[i])
      y[i] = abs(y[i])
    }
    else if(x[i] < 0 & y[i] == 0)
    {
      x[i] = abs(x[i])
      y[i] = y[i]
    }
    else if(x[i] < 0 & y[i] > 0)
    {
      x[i] = abs(x[i])
      y[i] = -1*y[i]
    }
  }
  output <- data.frame(x,y)
  return(output)
}
```

```
po<-positive.x(co.x,co.y) #convertendo os valores negativos em positivos
x<-po$x #vetores dos PICs já convertidos em valores positivos
y<-po$y #vetores dos PICs já convertidos em valores positivos
nc<- length(x) #número de contrastes
nt<- length(tree$tip.label) #número terminais da filogenia
poli<-matrix(table(tree$edge.length==0))
po<-poli[2,1] #número de ramos com valor zero
z<-po
```

```

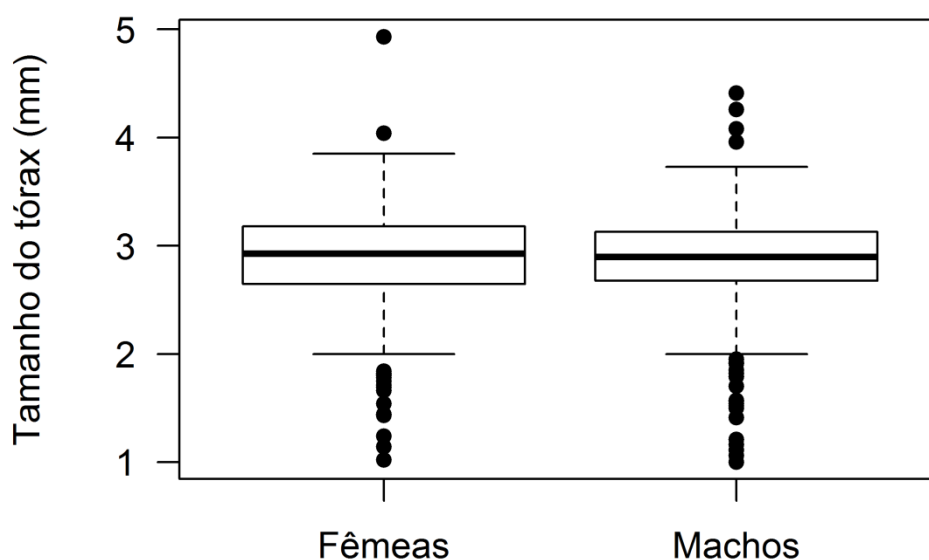
y2<-sum(y^2) #soma quadrada dos vetores
x2<-sum(x^2) #soma quadrada dos vetores
r<-sum(x*y)/((x2*y2)^0.5) #correlação (Martins & Garland, 1999)
beta<-(sum(x*y))/x2
beta.rma<-beta/r #rma
var.e<-(1/(nc-2-z))* (sum((y-(beta.rma*x))^2)) #variância dos resíduos
te<-qt(0.975, nt-2-z)
ci.inf<-beta.rma-(te*(sqrt(var.e/x2))) #intervalo de confiança inferior
ci.sup<-beta.rma+(te*(sqrt(var.e/x2))) #intervalo de confiança superior
parametro<-data.frame(beta.rma, ci.inf, ci.sup)
re<-list(parametro, x, y)
names(re)<-c("rma", "x", "y")
return(re)
}

```

**Anexo V**

### A5 - Análise dos outliers no tamanho de fêmeas e machos de Muscidae

Em Muscidae 25 espécies foram consideradas outliers (Figura 1), sendo as seguintes: *Atherigona orientalis*, *Bithoracochaeta annulata*, *Bithoracochaeta atricornis*, *Bithoracochaeta flavicoxa*, *Bithoracochaeta maricaensis*, *Bithoracochaeta plumata*, *Brachygasterina major*, *Brachygasterina violaceiventris*, *Brontaea cilífera*, *Brontaea quadristigma*, *Charadrella malacophaga*, *Haematobia irritans*, *Hydrotaea acuta*, *Lispe serotina*, *Neodexiopsis erecta*, *Neodexiopsis facilis*, *Neodexiopsis neoaustralis*, *Neodexiopsis nigerrima*, *Neodexiopsis paranaenses*, *Neodexiopsis paulistensis*, *Neodexiopsis setipuncta*, *Neodexiopsis similis*, *Schoenomyza napensis*, *Spathipheromyia atra* e *Synthesiomyia nudiseta*.

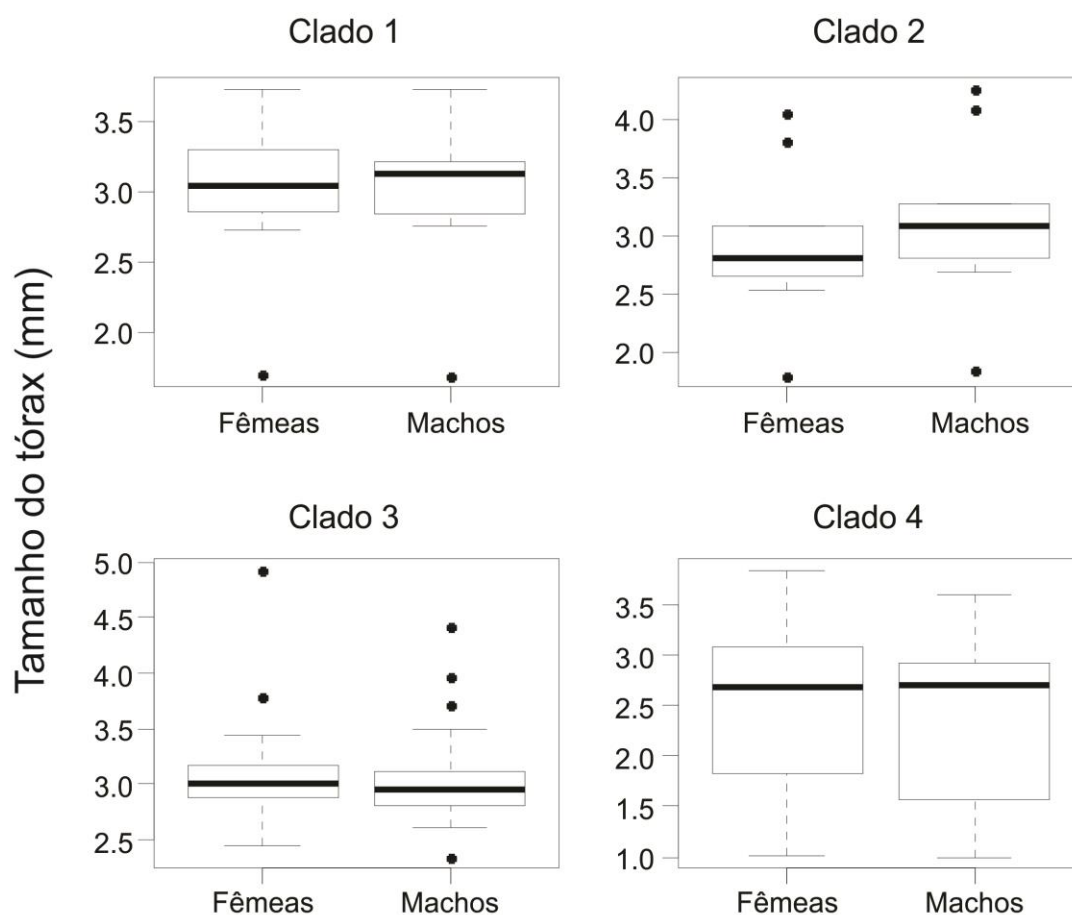


**Figura 1** – Análise de outliers. Boxplot do tamanho do tórax (mm) para machos e fêmeas de Muscidae. Linha horizontal central indica mediana, a caixa indica o intervalo entre o primeiro (Q1) e o terceiro quartil (Q3) e as linhas pontilhadas verticais indicam o valor de 1,5 vezes o limite interquartil. Pontos indicam outliers.



Mesmo após a retirada dos outliers a relação dos contrastes de machos e fêmeas de Muscidae manteve a isometria ( $\beta=0,96$ ; IC= 0,76; 1,15). A retirada dessas espécies praticamente não afetou o coeficiente angular, mas ampliou o intervalo de confiança.

No clado 1 a espécie *Haematobia irritans* é consideravelmente menor do que as demais espécies do clado (Figura 2), sendo considerada um outlier. Após a retirada dessa espécie a relação tamanho e SSD permaneceu isométrica, mas com uma redução no valor do coeficiente angular e do intervalo de confiança ( $\beta=0,79$ ; IC= 0,54; 1,04), indicando que essa espécie produz um forte viés na análise.



**Figura 2** – Boxplot do tamanho do tórax (mm) para machos e fêmeas dos quatro clados analisados. Linha horizontal central indica mediana, caixa indica o intervalo entre o segundo e o terceiro quartil e as linhas pontilhadas verticais indicam o valor de 1,5 vezes o limite interquartil. Pontos indicam outliers.

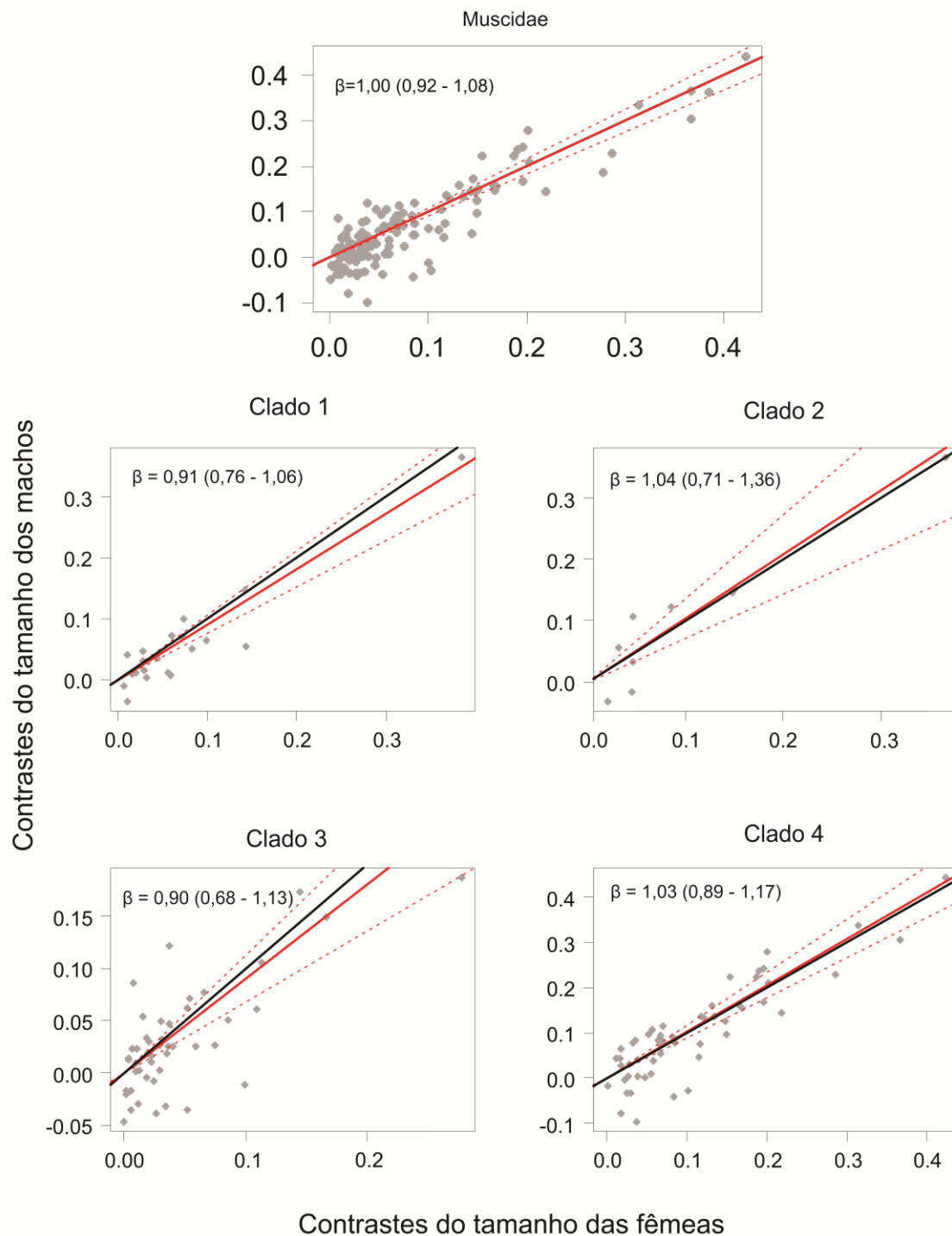
No clado 2, as espécies *Brachygasterina major*, *Brachygasterina violaceiventris* e *Hydrotaea acuta* foram tratadas como outliers (Figura 2). A retirada dessas espécies não afetou o padrão isométrico da relação tamanho x SSD, mas, o coeficiente angular e o amplitude do intervalo de confiança aumentaram consideravelmente ( $\beta=1,47$ ; CI= -4,36; 7,29). Provavelmente, o efeito nesse resultado deve-se ao pequeno tamanho amostral desse clado.

No clado 3 as espécies *Charadrella malacophaga*, *Muscina stabulans*, *Synthesiomyia nudiseta* e *Cyrtoneuropsis walkeri* foram tratadas como outliers (Figura 2) Após a retirada dessas espécies da análise o modelo permaneceu isométrico com um aumento do coeficiente angular e uma ampliação do intervalo de confiança ( $\beta=0,98$ ; CI= 0,59; 1,38).

Não foi detectado nenhum outlier no clado 4 (Figura 2).

**Anexo VI**

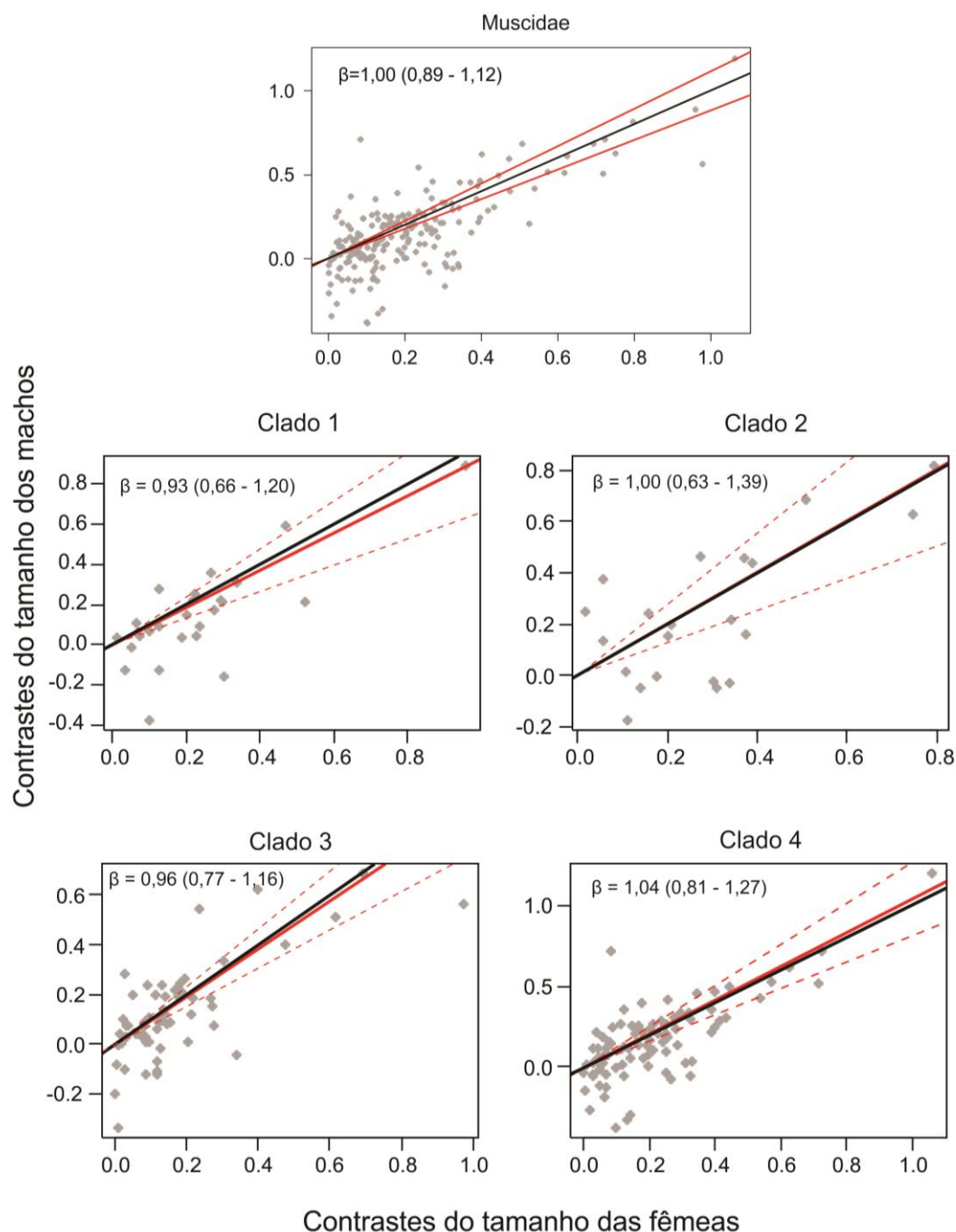
## A6 – Resultado da análise alométrica utilizando os dados logaritmizados



**Figura 1** – Regressão por eixo principal reduzido (RMA) dos contrastes independentes dos machos (PICs) em relação aos contrastes independentes das fêmeas (PICs) do tamanho médio logaritimizado do tórax das espécies de Muscidae e dos quatro clados subordinados a Muscidae. A linha escura representa o modelo isométrico ( $\beta=1$ ) e linha vermelha representa o ajuste do modelo RMA com intervalo de confiança de 95% (linhas tracejadas).

**Anexo VII**

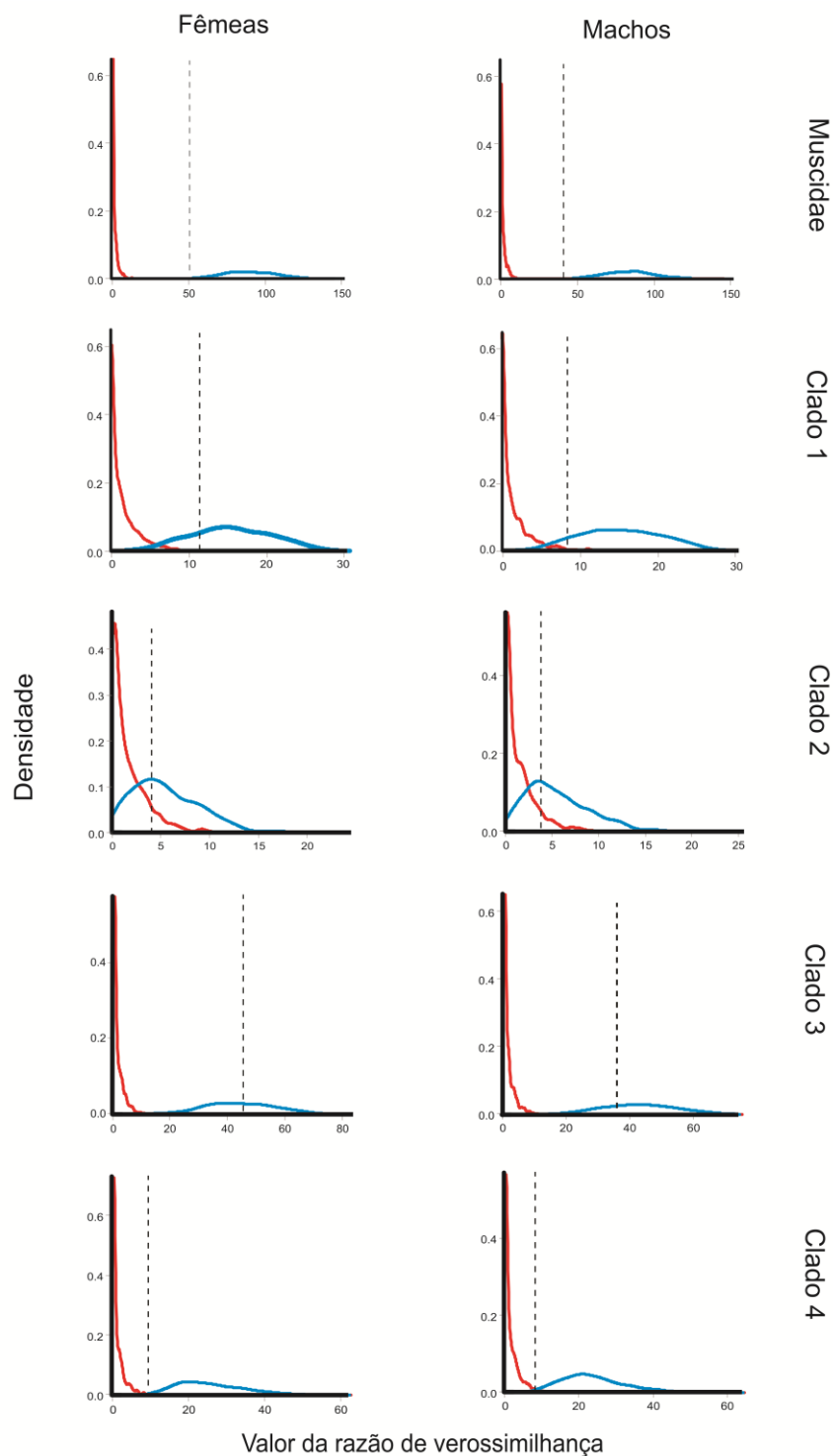
### A7– Resultado da análise alométrica sem nível de corte amostral mínimo



**Figura 1** – Regressão por eixo principal reduzido (RMA) dos contrastes independentes dos machos (PICs) em relação aos contrastes independentes das fêmeas (PICs) do tamanho médio do tórax das espécies de Muscidae e dos quatro clados subordinados a Muscidae sem corte mínimo do tamanho amostral. A linha escura representa o modelo isométrico ( $\beta=1$ ) e linha vermelha representa o ajuste do modelo RMA com intervalo de confiança de 95% (linhas tracejadas).

**Anexo VIII**

# A8– Resultado da análise de Monte Carlo Filogenética (PMC)



**Figura 1** – Distribuição dos valores da razão de verossimilhança para os modelos BM e OU ajustados em 1000 simulações de dados gerados pela análise de PMC. A distribuição delimitada pela linha vermelha indicam os valores de LRT dos dados gerados pelo modelo de BM e a distribuição delimitada pela linha azul indicam os valores de LRT dos dados gerados pelo modelo de OU. A linha vertical tracejada indica o valor de LRT observado do ajuste do modelo BM e OU para Muscidae.